

Immunfluoreszenz mit Kollagen VI Antikörpern an  
Muskelkryostatschnitten als Screeningmethode einer  
kongenitalen Muskeldystrophie vom Typ Ullrich

Janina Lagocki

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kinderheilkunde I  
Bereich Neuropädiatrie, Entwicklungsneurologie und Sozialpädiatrie

Immunfluoreszenz mit Kollagen VI Antikörpern an  
Muskelkryostatschnitten als Screeningmethode einer  
kongenitalen Muskeldystrophie vom Typ Ullrich

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Janina Lagocki  
aus  
Münster  
2009

Dekan:	Herr Univ.- Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachterin:	Frau Priv.- Doz. Dr. med. U. Schara
2. Gutachterin:	Frau Priv.- Doz. Dr. med. D. Wieczorek

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2009

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	Historisches	5
1.2	Allgemeines	5
1.3	Kongenitale Muskeldystrophie (CMD)	7
1.4	kongenitale Muskeldystrophie vom Typ Ullrich (UCMD)	9
1.5	Bethlem Myopathie (BM)	11
1.6	Kollagen	11
1.7	Kollagen VI	12
1.8	Mutationen in den Kollagen VI Genen	13
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1	Patienten	16
2.2	Muskel	36
2.2.1	Gewebeaufbereitung	36
2.2.2	Schneiden der Muskelpräparate	36
2.2.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	37
2.2.4	Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten	37
2.2.5	Primäre Antikörper	38
2.2.6	Sekundäre Antikörper	40
2.2.7	Mikroskopieren und Bilderfassung	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
3.2	Immunfluoreszenzfärbung	42
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>49</b>
4.1	Zusammenfassende Ergebnisse	49
4.2	Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeiten	52
4.3	Unterschiede in der Intensität der Färbung mit verschiedenen Kollagen VI Antikörpern	55
4.4	Ergebnis Mutationsanalyse Patient 139/01	57
4.5	Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung mit Neonatalem Myosin und Laminin $\alpha 5$	58

4.6	Diagnosen der Patienten mit unauffälliger Immunfluoreszenz-Färbung	59
4.7	Methodenkritik Immunfluoreszenz	59
4.8	Ausblick	60
4.9	Zusammenfassung	62
5	LITERATUR	63
6	TABELLENVERZEICHNIS	70
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	71
8	DANKSAGUNG	72
9	LEBENS LAUF	73

# 1 Einleitung

## 1.1 Historisches

Wilhelm Erb prägte 1884 den Begriff „Muskeldystrophie“ (Erb 1884). Er vermutete aufgrund beobachteter Gemeinsamkeiten bei verschiedenen dystrophischen Muskelerkrankungen eine gleiche Pathogenese der Erkrankungen.

In pathologisch-anatomischen Untersuchungen fand Erb keine oder nur unbedeutende Veränderungen am zentralen Nervensystem und an den peripheren Nerven, während in den Muskeln unterschiedlicher Formen der Muskeldystrophie ähnliche Veränderungen auffielen (so z.B. Kaliberschwankungen der Muskelfasern, Vermehrung des endomysialen Bindegewebes und Fett-Vakat-Wucherungen).

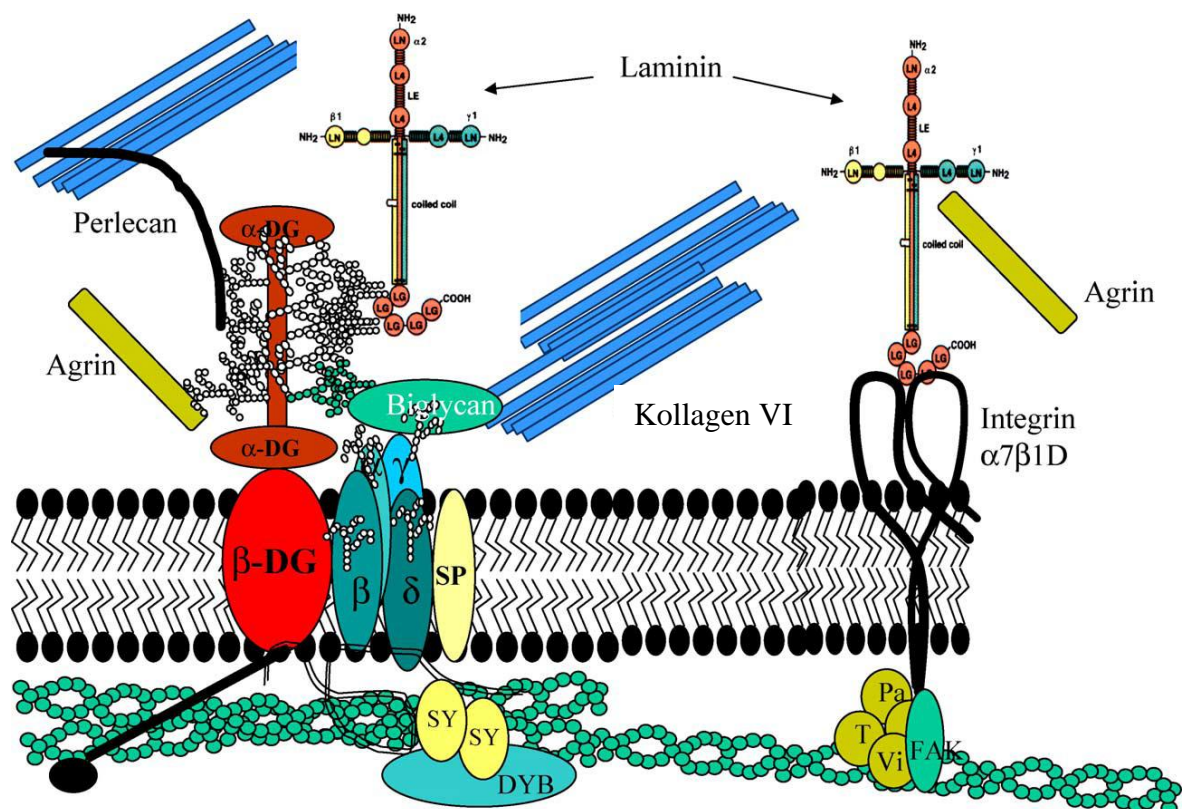
## 1.2 Allgemeines

Der Begriff „Muskeldystrophie“ beschreibt zahlreiche erblich bedingte Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit die fortschreitende Degeneration des Skelettmuskels selbst ohne strukturelle Veränderungen des Zentralnervensystems oder Veränderungen peripherer Nerven ist.

Es gibt verschiedene Formen von Muskeldystrophien, die sich unter anderem in dem betroffenen Protein, ihrem Alter der Erstmanifestation, in ihrem Schweregrad oder ihrem Vererbungsweg unterscheiden.

Häufige Formen sind die Dystrophinopathien vom Typ Duchenne und der Typ Becker-Kiener. Beide werden X-chromosomal rezessiv vererbt. Autosomal-rezessiv werden die Gliedergürtel-Muskeldystrophien 2A, 2B, 2C etc., die heterogene Gruppe der kongenitalen Muskeldystrophien, sowie die distalen Muskeldystrophien vererbt. Einen autosomal-dominanten Erbgang weisen folgende Dystrophien auf: die fazio-skapulo-humerale Muskeldystrophie, die Gliedergürtel-Muskeldystrophien 1A, 1B, 1C etc., die myotonische Dystrophie Typ1 und 2 sowie einige Formen der distalen Muskeldystrophie. Die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie kann sowohl X-chromosomal, autosomal-rezessiv als auch autosomal dominant vererbt werden.

Für zahlreiche Formen der Muskeldystrophie sind die chromosomalen Lokalisationen, das betroffene Gen und das Genprodukt bekannt.



**Abbildung 1** Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Lokalisation der Proteine in der Zellmembran-Zusammensetzung. Besonders Dystroglycan, Laminin  $\alpha 2$ , der Integrin-Komplex und Kollagen VI werden sichtbar gemacht. (nach Muntoni und Voit, NMD 2004)

### 1.3 Kongenitale Muskeldystrophie (CMD)

Batten beschrieb 1903 in London als erster eine Krankheit, die heute vereinbar mit dem Begriff einer kongenitalen Muskeldystrophie ist.

Der Begriff „Kongenitale Muskeldystrophie“ wird benutzt, um eine Gruppe von Störungen im Kindesalter zu beschreiben, die durch Muskelschwäche und Hypotonie seit Geburt oder frühem Kindesalter sowie Gelenkkontrakturen charakterisiert sind. Bei der morphologischen Analyse des Skelettmuskels fallen dystrophische Veränderungen auf (Voit 1998, Muntoni et al., 2002). Die Merosin-Mangel CMD ist wahrscheinlich die häufigste Form der CMDs weltweit (Fardeau et al., 1995; Dubowitz et al., 1996). Diese Erkrankung wird durch einen Mangel der Laminin  $\alpha$ 2-Kette („Merosin“) in verschiedenen Geweben, v.a. im Skelettmuskel verursacht.

Man kann die kongenitalen Muskeldystrophien nach ihren primären Gen-Defekten in verschiedene biochemische Gruppen einteilen (Muntoni und Voit, NMD 2004):

Die erste Gruppe betrifft Gene, die strukturelle Proteine der basalen Zellmembran oder der extrazellulären Matrix der Skelettmuskelfasern kodieren. Diese Gruppe beinhaltet die Kollagen VI-Gene, die Laminin  $\alpha$ -2 Kette und Integrin  $\alpha$ 7.

In der zweiten Gruppe sind Gene betroffen, die mögliche oder bewiesene Glykosyltransferasen kodieren, welche ihrerseits die Glykosilierung von Dystroglycan, einem externen Membran-Protein der basalen Zellmembran, steuern. Gene, die in diese Kategorie gehören, sind POMT1; POMGnT1; Fukutin, Fukutin-verwandte Proteine (FKRP); Large.

Zur dritten Gruppe zählt Selenoprotein 1, welches ein endoplasmatisches Retikulum-Protein mit unbekannter Funktion kodiert.

Eine exemplarische Übersicht der verschiedenen kongenitalen Muskeldystrophien ist in Tabelle 1 dargestellt.



Protein Kategorie	Erkrankung	Abkürzung	Gen- symbol	Genort	Protein	Serum- CK
Extrazelluläre Matrix-Proteine	Merosin-Mangel- CMD	MDC1A	<i>LAMA 2</i>	6q2	Laminin $\alpha 2$	↑↑↑
	Ullrich CMD	UCMD 1	<i>COL6A1</i>	21q2	Kollagen VI	= ↑
		UCMD2	<i>COL6A2</i>	21q2	Kollagen VI	
		UCMD3	<i>COL6A3</i>	2q3	Kollagen VI	
	Integrin $\alpha 7$ - Mangel		<i>ITGA7</i>	12q	Integrin $\alpha 7$	=
Glykosyltransferasen (Varianten mit abnormaler Glykosilierung von $\alpha$ -Dystroglycan)	Walker-Warburg Syndrom	WWS	<i>POMT1</i>	9q34	Protein-O-Mannosyl- transferase	↑↑↑
	Muscle-eye- brain (Muskel-Augen- Gehirn-Krankheit)	MEB	<i>POMGnT1</i>	1p3	O-linked mannose beta 1,2acetylglucosaminyl- transferase	↑↑↑
	Fukuyama CMD	FCMD	<i>FCMD</i>	9q3	Fukutin	↑↑↑
	CMD+ sekundärer Merosin-Mangel 1	MCD1B	?	1q4	?	↑↑↑
	CMD+ sekundärer Merosin-Mangel 2	MCD1C	<i>FKRP</i>	19	Fukutin related protein	↑↑
	CMD mit men- taler Retardierung und Pachygyrie	MCD1D	<i>Large</i>	22q	Large	↑↑↑
Proteine des endoplasmatischen Retikulums	Rigid spine Syndrom (RSS)	RSMD 1	<i>SEPN1</i>	1p3	Selenoprotein N,1	= ↑

**Tabelle 1 kongenitale Muskeldystrophien, modifiziert nach Muntoni et Voit (NMD 2004)**

## 1.4 kongenitale Muskeldystrophie vom Typ Ullrich (UCMD)

Die Ullrich CMD ist eine merosin-positive CMD, welche durch Mutationen im Kollagen VI Gen verursacht wird. (Berlini and Pepe, 2002).

Die Erkrankung wurde erstmalig von Otto Ullrich 1930 als „atonisch-sklerotische Muskeldystrophie“ beschrieben.

Er berichtete über zwei nicht miteinander verwandte Patienten mit einem „ungewöhnlichen angeborenen Muskelleiden“. Direkt postnatal fielen bei den Jungen eine ausgeprägte Hypotonie sowie ein Torticollis mit Skoliose und Kontrakturen einzelner großer Gelenke auf. Die geistige Entwicklung war normal. Ein Junge starb im Alter von zwei Jahren an einer systemischen Pneumokokken-Infektion. Die anschließende Autopsie sowie histologischen Untersuchungen konnten keine Anomalitäten des zentralen Nervensystems oder peripherer Nerven zeigen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung verschiedener Muskeln fielen hochgradige pathologische Veränderungen auf, wie z.B. ein abnormer Bindegewebsreichtum.

Die signifikanten klinischen Merkmale der „Ullrich kongenitalen Muskeldystrophie“ sind (100th ENMC International Workshop, 2001):

- Seit Geburt / früher Kindheit bestehend
- Generalisierte Muskelschwäche und Muskelschwund
- Kontrakturen der proximalen Gelenke
- Hyperflexibilität der distalen Gelenke
- Progressiver Verlauf
- Normale Intelligenz
- Respiratorische Probleme (erhöhte Infektanfälligkeit / Zwerchfellparalyse)

Es werden Fälle unterschiedlichen Schweregrades beschrieben. Bei den meisten Patienten zeigt sich jedoch ein schwerer Verlauf. Oft sind die Kinder nicht fähig, alleine zu gehen oder haben diese Fähigkeit im Verlauf der Erkrankung wieder verloren. Die Muskelbiopsien zeigen u.a. myopathische Veränderungen mit einer starken Variation der Fasergröße und einer deutlichen Vermehrung des

endomysialen Bindegewebes. Des Weiteren fallen zentral gelegene Muskelfaserkerne und vereinzelt nekrotische Fasern mit aktiver Phagozytose auf (Nonaka et al., 1980).

In Familien, in denen die UCMD vorkommt, konnte ein autosomal-rezessiver Erbgang determiniert werden (Nonaka et al., 1981). Es sind Mutationen beschrieben, die alle drei Ketten von Kollagen VI betreffen. Kollagen VI besteht aus drei Ketten, der  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  Kette. Die drei Ketten werden von den Genen *COL 6A1*, *COL6A2* und *COL6A3* codiert. *COL6A1* und *COL6A2* befinden sich auf dem Chromosom 21q22.3, das *COL6A3* Gen auf dem Chromosom 2q37 (Weil et al., 1988).

Mittlerweile wurden auch dominante de novo Mutationen bei UCMD beschrieben. (Baker et al., 2005; Pan et al., 2003).

Zur Anschauung der typischen Merkmale einige Bilder:



**A:** Ausgeprägte Muskelhypotonie



**B:** Hyperflexibilität der distalen Gelenke



**C:** Hyperflexibilität der distalen Gelenke



**D:** Ausgeprägte Muskelhypotonie, Kontrakturen

**Abbildung 1 A-D Klinische Bilder einer UCMD, nach Higushi et al., 2001**

## 1.5 Bethlem Myopathie (BM)

Mutationen im Kollagen VI-Gen können zu einer weiteren Erkrankung führen: der Bethlem Myopathie (BM). Die BM wurde 1976 zuerst von Bethlem und van Wijngaarden als autosomal-dominant vererbte, milde proximale Myopathie beschrieben. Die BM war die erste Störung, die mit Mutationen im Kollagen VI Gen in Zusammenhang gebracht worden ist (Jobsis et al., 1996). Die BM wird als relativ milde neuromuskuläre Erkrankung betrachtet. Sie wird autosomal-dominant vererbt. Typische Merkmale sind Gelenkkontrakturen und langsam progressive Muskelschwäche. Die Gelenkkontrakturen können Nacken-, Ellbogen-, Knie- und Interphalangeal-Gelenke (Merlini et al., NMD 2002) betreffen und schon bei Geburt vorhanden sein (Jöbsis et al., 1999). Die Kreatinkinase zeigt eine variable Erhöhung bis zum 15-fachen der Norm (Bethlem, Wijngaarden 1976, Merlini et al. 1994; 2002; Jöbsis et al., 1999). Es wurde bisher über „missense- und splicing“-Mutationen aller drei Kollagen VI Gene bei Patienten mit Bethlem Myopathie berichtet (Jöbsis et al., 1996, Pan et al., 1998, Pepe et al., 1999, Camacho, Pepe et al., 2002). Zusätzlich konnte eine funktionelle Haploinsuffizienz des *COL6A1* Gens in drei Patienten gezeigt werden (Lamande et al., 1998, Lamande et al., 1999, Pepe et al., 1999).

## 1.6 Kollagen

Kollagen ist neben Fibrillin, Elastin und den Proteoglykanen der wichtigste Grundbaustoff der Haut, der Knochen, der Knorpel, der Sehnen, der Blutgefäße und vieler innerer Organe. Kollagen wird in den stoffwechselaktiven Zellen des jeweiligen Binde- und Stützgewebe gebildet (z.B. Fibroblasten im Bindegewebe, Chondroblasten im Knorpel, Myoblasten im Muskelgewebe). Vom Kollagen sind bisher 12 Subtypen bekannt.

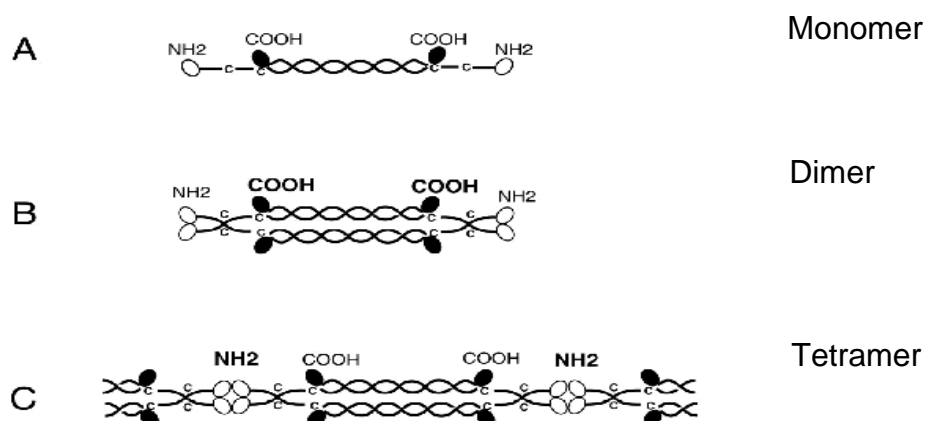
<b>Kollagen</b>	<b>Vorkommen</b>
Typ I	Haut, Knochen, Sehnen
Typ II	Knorpel, Glaskörper
Typ III	Haut, Blutgefäße, retikuläres Bindegewebe
Typ IV	alle Basalmembranen
Typ V	interstitielles Gewebe
Typ VI	interstitielles Gewebe
Typ VII	Haut
Typ VIII	Endothel
Typ IX-XII	Knorpel

**Tabelle 2 Kollagentypen und ihr Vorkommen**

Kollagene Fasern setzen sich aus einzelnen unverzweigten Fibrillen von 0,2-0,5 µm Durchmesser und einer mukopolysaccharidhaltigen Kittsubstanz zusammen. Die Fasern entstehen extrazellulär aus den von Fibroblasten ausgeschiedenen Proteinmolekülen.

## 1.7 Kollagen VI

Kollagen VI (COL VI) ist ein ubiquitäres extrazelluläres Matrix Protein. Es hat zell-adhäsive Eigenschaften. Seine Aktivität ist vergleichbar mit Laminin, Fibronectin und Kollagen IV (Aumailley et al, 1989; Wayner and Cartner, 1987). Kollagen VI besteht aus drei Ketten, der  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\alpha 3$ -Kette. Die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten sind ca. 140 kDa groß. Jede Kette enthält eine Tripel-Helix-Domäne, die jeweils von N- und C-terminalen globulären Domänen flankiert sind. Im Gegensatz dazu ist die  $\alpha 3$ -Kette viel größer (250-300 kDa) mit erweiterten N- und C-globulären Domänen. Die Ketten formen jeweils ein Monomer, das aus zwei globulären Domänen besteht, die durch eine kurze Tripel-Helix (bestehend aus Gly-Xaa-Yaa-Aminosäuren repeat Sequenzen) verbunden sind. Die Monomere verbinden sich zu Dimeren und anschließend zu Tetrameren. Die Tetramere werden in den Extrazellulärraum sezerniert, wo sie dann zu End-zu-End-verbundenen Mikrofibrillen assoziieren (Furthermyer, Timpl et al., 1983; Pepe, Bertini et al., 2002). Die Kollagen VI Mikrofibrillen assoziieren mit Hyaluronsäure, diese Interaktion ist essentiell für die Fibrillen-Zusammensetzung.



## 1.8 Mutationen in den Kollagen VI Genen

Mutationen in allen drei Kollagen VI Genen können sowohl eine Bethlem Myopathie als auch eine Ullrich kongenitale Muskeldystrophie verursachen. Mittlerweile besteht zwischen den Erkrankungen ein klinisches Kontinuum.

Die zuerst entdeckten Mutationen, die zu einer UCMD führen, sind Mutationen im *COL6A2* Gen. Sie resultieren in „Frameshifts“ und führen nachfolgend zu vorzeitigen Stop-Codons an verschiedenen Positionen entlang der mRNA (Higuchi et al., 2001, Camacho, Vanegas et al., 2001).

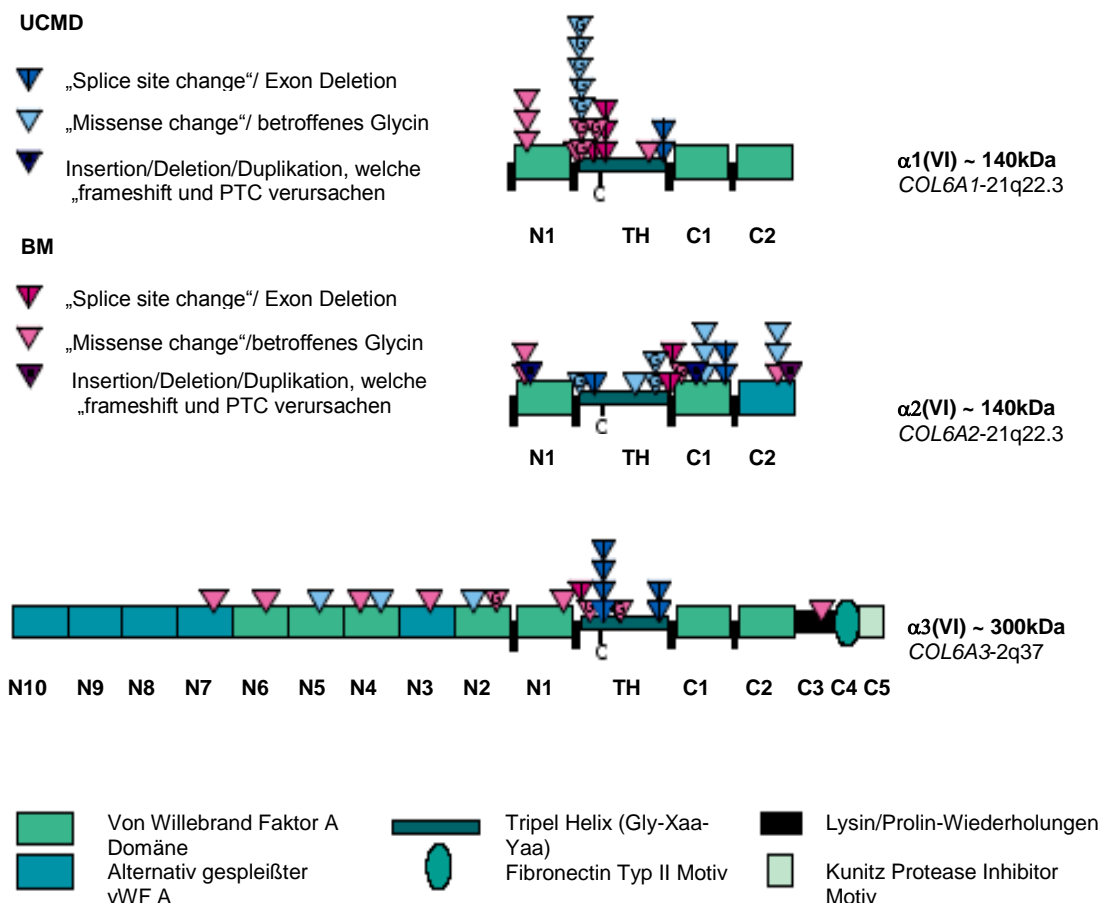
Lampe et al. publizierten 2005 eine Arbeit, in der sie mittels SCAIP (single condition amplification/internal primer) eine Methode für schnelle, robuste und ökonomische Direkt-Sequenz-Analyse aller 107 Exons der Kollagen VI-Gene entwickelten.

Es wurden 26 Patienten untersucht, die klinische Merkmale einer UCMD aufwiesen. Es konnten 21 unterschiedliche putative Mutationen gefunden werden. Vier Mutationen wurden im *COL6A1* Gen, 11 im *COL6A2* Gen und sechs im *COL6A3* Gen entdeckt. Sieben dieser Mutationen verursachen ein „splicing“, zwei Mutationen führen zu vorzeitigen Stop-Codons. 12 Mutationen verursachen nicht-synonyme Amino-Säure-Substitutionen und sind somit putative „missense“-Mutationen.

Des Weiteren wurden in der Arbeit 53 Patienten untersucht, die das klinische Bild

einer BM aufwiesen. Hier wurden 23 Mutationen gefunden. Sieben dieser Mutationen sind im *COL6A1* Gen lokalisiert, sechs im *COL6A2* Gen und zehn im *COL6A3* Gen. Von diesen 23 Mutationen sind fünf dazu prädestiniert, ein „splicing“ zu verursachen. Eine Mutation im *COL6A2* Gen führt zu einem „Frameshift“ und somit zu einem vorzeitigen Stop Codon. 17 Mutationen bedingen nicht-synonyme Amino-Säure-Substitutionen und sind putative missense Mutationen.

### Hoch-Durchlauf-Kollagen VI Sequenzierung



Lokalisation der möglichen Mutationen. Schematisches Diagramm der Domänen-Strukturen der Protein-Ketten, die vom *COL6A1-3* Gen kodiert werden. Alle drei Ketten enthalten eine globuläre Domäne, die sich aus vWFA-like-Motiven zusammensetzen. Kurze Cystein-reiche Verbindungs-Peptide trennen N2, N1, Tripel Helix, C1 und C2. Die Tripel Helix enthält einen Cystein-Rest (als „C“ abgekürzt, welches wichtig für die Dimer-Zusammensetzung ist).

**Abbildung 2 Schema der identifizierten putativen Mutationen, nach Lampe et al., 2005**

## 1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Muskelbiopsien von 17 Patienten, die klinische Merkmale einer UCMD aufweisen, mittels Immunfluoreszenz auf einen Kollagen VI Mangel untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Kollagen-VI-Antikörper verwendet (MAB 1944, MAB 3303 von der Firma Chemicon, N9-N2 von R. Timpl). Die Färbung mit den Kollagen VI Antikörpern soll als Screening-Untersuchung für eine mögliche UCMD dienen. Es soll untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen einem sichtbaren Kollagen VI Mangel und der Schwere der Erkrankung gibt. Ferner stellt sich die Frage, ob es Unterschiede in der Anfärbung der einzelnen Antikörper gibt, die Hinweise auf die möglicherweise betroffenen Genbereiche der Mutationen geben können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

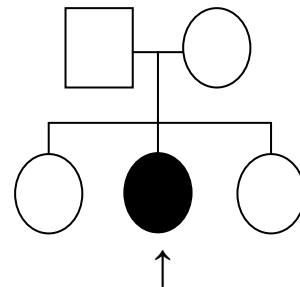
Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 17 Patienten untersucht, die nach diagnostischen Kriterien des ENMC (European Neuromuscular Centre, Neuromuscular Disorders, 2002) für eine kongenitale Muskeldystrophie vom Typ Ullrich (UCMD) in Frage kamen. Um der phänotypischen Variabilität dieser Erkrankung Rechnung zu tragen, wurden auch Patienten mit der Diagnose kongenitale Muskeldystrophie (CMD) ohne bisherige nähere Klassifizierung in die Untersuchung miteinbezogen. Die diagnostischen Kriterien für eine Ullrich CMD sind vielfältig. Es liegt meist ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus vor. Es bestehen neonatale Auffälligkeiten wie Hypotonie und Hüft-Dislokation. Die motorischen Meilensteine werden nur verzögert erreicht. Die Patienten haben eine generalisierte, langsam progrediente Muskelschwäche, wobei die faziale Muskulatur nur gering betroffen ist. Die distalen Gelenke (Hände, Füße, Finger) sind oft hyperlaxibel. An den proximalen Gelenken finden sich häufig Kontrakturen. Die Patienten können einen Torticollis, eine limitierte Nacken-Flexion oder eine Kyphoskoliose aufweisen. Es kann zu einer frühen Einschränkung der Atmung kommen. Einige Patienten erlernen nie das freie Gehen. Das ZNS ist nicht beeinträchtigt, die Patienten weisen eine normale Intelligenz auf. Der Wert der Serum-Kreatinkinase (CK) ist normal oder nur gering erhöht. In der Histologie sieht man myopathische bis dystrophische Muskelfasern mit großer Kaliberdifferenz sowie eine interstitielle Fibrose. Auch nekrotische und regenerierende Prozesse können auftreten. Die Immunfluoreszenz-Färbung mit Kollagen VI-Antikörpern zeigt eine partielle oder komplette Verminderung von Kollagen VI. Die Diagnose kann durch *COL6* Gen-Mutationen belegt werden.

Die in dieser Arbeit verwandten Muskelproben stammen hauptsächlich aus Biopsien, die an der Kinderklinik der Universität Essen vorgenommen wurden. Die Normalkontrollen wurden bei orthopädischen Operationen nach vorheriger Einwilligung von Patienten gewonnen, bei denen keinerlei neuromuskuläre Erkrankung vorlag. Die Muskelbiopsien der Normalkontrollen zeigten

lichtmikroskopisch und immunhistologisch keine Auffälligkeiten. Die Biopsien wurden zum Zwecke der Diagnosestellung als offene oder Nadelbiopsien aus dem M. quadriceps femoris gewonnen.

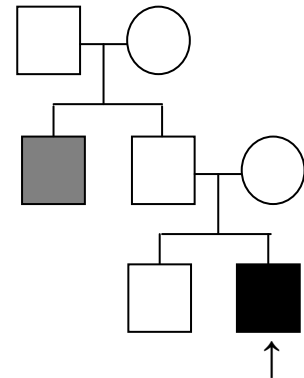
### **Patientin 54/98**

Die Patientin 54/98 wurde 1988 aufgrund einer Beckenendlage per Sectio termingerecht geboren. Während der Schwangerschaft waren eine relativ geringe Gewichtszunahme von sechs kg im Vergleich zu zehn kg beim erstgeborenen Kind sowie schwache Kindsbewegungen aufgefallen.



Das Gewicht betrug bei der Geburt 3940 g, die Größe 56cm. Das Mädchen hat eine ältere und eine jüngere Schwester, die jeweils gesund sind. Das Erlernen von Sitzen und Krabbeln war verzögert; Laufen konnte die Patientin verzögert mit 21 Monaten. Die intellektuelle Entwicklung ist normal, das Mädchen besucht eine integrative Gesamtschule und ist eine gute Schülerin. Die Sprachentwicklung war abgesehen von einer Dyslalie unauffällig. Die Patientin schaffte mit Unterstützung eine Gehstrecke von ca. 200 m; freies Sitzen war möglich. Die Arme konnten nicht über das Schulterniveau hochgehoben werden. Die Lungenfunktion war herabgesetzt, das FEV<sub>1</sub> betrug 17% der altersentsprechenden Norm (FEV<sub>1</sub>/FVC: 85%). Bei einer ambulanten Vorstellung im April 2003 fiel eine generalisierte Muskelschwäche und Muskelatrophie auf. Die Haut war hyperelastisch. Es bestanden Kontrakturen in den oberen Sprunggelenken, in den Ellbeugen sowie in den Kniegelenken. Die Patientin hatte eine rechtskonvexe BWS-Skoliose. Des Weiteren sah man eine diskrete Ptosis beidseits und eine Lidschlusschwäche. Die Prüfung der übrigen Hirnnerven zeigte keine Besonderheiten. Muskeleigenreflexe waren beidseits regelrecht auslösbar. Stuhlgang und Miktion waren regelrecht. Der Wert der Kreatinkinase war nicht erhöht. Die Symptome Muskelhypotonie und Kontrakturen dieser Patientin lassen sich klinisch mit der Diagnose CMD Ullrich vereinbaren.

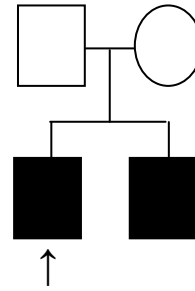
Patient 18/01 kam 1998 in der 38. SSW nach unkomplizierter Schwangerschaft auf die Welt (Größe 51 cm, Gewicht 3100 g). Die Eltern sind gesund und nicht miteinander verwandt. Der ältere Bruder des Patienten ist gesund. Der jüngere Bruder des Vaters soll an einer nicht näher erläuterten Muskelhypotonie leiden. Bei dem Patienten fiel bei der Vorsorgeuntersuchung U2



18

## Patient 82/01

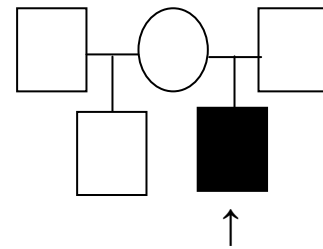
Patient 82/01 wurde per Kaiserschnitt geboren. Das Gewicht betrug 3130 g und die Größe 50 cm. Die Schwangerschaft wurde durch ein Anhydramnion sowie einen Harnwegsinfekt der Mutter kompliziert. Aufgrund des Anhydramnions kam es zu einer intrauterinen Zwangshaltung des



Feten, die auch postpartal weiterbestand. Die Eltern des Patienten sind nicht miteinander verwandt. Die Mutter ist gesund; der Vater leidet an einer medikamentös eingestellten Epilepsie. Ein Bruder des Vaters soll laut Angaben des Vaters als Kind Gangschwierigkeiten gehabt haben, die sich aber im Laufe der Zeit vollkommen zurückgebildet haben. Der jüngere Bruder des Patienten leidet an ähnlichen Symptomen wie der Patient. Im ersten Lebensjahr wurde der Patient aufgrund eines Torti collis, einer Hüftdysplasie und multipler Kontrakturen mehrfach operiert. Die Meilensteine der Entwicklung wurden zeitgerecht erreicht: Sitzen konnte der Patient mit sechs Monaten; das Laufen erlernte er mit 12 Monaten (Watschelgang). Im Alter von sieben Jahren kam es zu einer deutlichen Verschlechterung der Gehfähigkeit, nach zehn Schritten war der Patient zu erschöpft, um weiterzugehen. Der Patient besuchte eine Körperbehindertenschule. Bei der klinischen Untersuchung sah man einen hypotonen Jungen in gutem Allgemein- und gutem Ernährungszustand. Die grobe Kraft war vermindert; es bestand eine generalisierte Muskelschwäche. Die Haut war sehr trocken. Man sah eine deutliche Kopfneigung nach rechts sowie Genua valga. Der Patient hatte beidseits Spitzfüße, Kontrakturen der Ellbogengelenke (Streckdefizit 40°) und Kontrakturen beider Kniegelenke (Streckdefizit 20°). Die Muskeleigenreflexe waren nur schwach auslösbar. Beim Gangbild fiel die Innenrotation der Füße auf. Das Aufstehen vom Boden gelang nur mit Hilfen, an denen sich der Patient hochziehen konnte. Die vegetativen Funktionen waren unauffällig. Der CK-Wert lag im Normbereich. Die multiplen Kontrakturen sowie die generalisierte Muskelschwäche können auf eine CMD Ullrich hinweisen.

## Patient 117/01

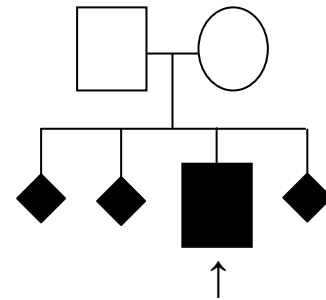
Patient 117/01 ist nach unauffälliger Schwangerschaft aufgrund einer mütterlichen Neoplasie im Gebärmutterhals in der 33. Schwangerschaftswoche per sectio geboren worden. Er wog 2330 g und war 49 cm groß.



Postpartal zeigte sich eine Hypotonie, die sich zunächst später zurückgebildet hat. Die Eltern und ein Halbbruder aus der ersten Ehe der Mutter sind gesund. Sitzen konnte der Patient mit elf Monaten, Krabbeln mit zwei Jahren. Bis zum vierten Lebensjahr konnte er nicht laufen. Die Sprachentwicklung war nur geringgradig verzögert; es bestanden bisher keine weiteren intellektuellen Defizite. Der letzte klinische Untersuchungsbefund lag aus dem Februar 2001 vor. Der damals fast vierjährige Junge befand sich in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Die Muskelkraft war generalisiert deutlich reduziert. Der Patient hatte leichte Beugekontrakturen der Knie und Füße sowie eine Beuge- und Adduktionshemmung in den Hüftgelenken. Die Wirbelsäule war unauffällig. Muskeleigenreflexe waren beidseits nicht auslösbar. Es zeigten sich keine pathologischen Reflexe. Es bestand keine Gang-Ataxie. Freies Sitzen war gut möglich. Der Patient zeigte einen Vierfüßlerstand. Durch Robben auf dem Gesäß konnte er sich fortbewegen. Die Arme konnten über den Kopf gehoben werden, hierbei bildeten sich deutliche Scapulae alatae aus. Aus der Rückenlage war ein Aufrichten nur über die Bauchlage möglich. Im Hängen bestand ein Durchrutschen der Arme. Bei Stuhlgang und Miktion gab es keine Besonderheiten. Der Wert der Kreatinkinase war mit Werten zwischen 148 und 188 U/l etwas erhöht. Die klinischen Symptome, vor allem die Muskelhypotonie und die Beugekontrakturen sind mit einer Ullrich CMD vereinbar.

### Patient 142/01

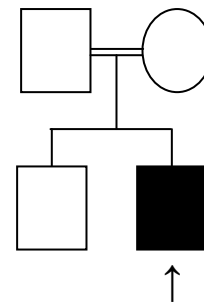
Patient 142/01 ist das erstgeborene Kind nach zwei Aborten (14. und 11. SSW). Bei einer Chromosomenanalyse der Mutter stellte man eine reziproke, balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 2 und 4 sowie eine perizentrische Inversion Typ I eines Chromosoms 9 fest. Leider



konnten keinerlei Angaben gefunden werden, ob der Patient ebenfalls derartige Auffälligkeiten in seinem Chromosomensatz aufweist. Der Junge wurde per Kaiserschnitt geboren, da es zu einem protrahierten Geburtsverlauf kam. Größe (54 cm) und Gewicht (3880 g) waren normal. Bei den Meilensteinen der motorischen Entwicklung bestand zunächst keine Verzögerung. Auffälligkeiten zeigten sich erst im Alter von ca. 20 Monaten. Sie äußerten sich in häufigem Hinfallen und der Unfähigkeit zum Treppensteigen. Die Muskelschwäche verschlechterte sich zunehmend, sodass es 05/98 (mit sechs Jahren) zu einem Verlust der Gehfähigkeit kam. Seit Januar 2001 ist der Patient aufgrund einer nächtlichen Hypoventilation auf eine nächtliche BIPAP-Beatmung angewiesen. Bei der Lungenfunktionsprüfung zeigte sich eine ausgeprägte restriktive Ventilationsstörung. Mit neun Jahren wurde der Patient wegen einer progredienten Skoliose operiert. Im Januar 2003 befand sich der Patient bei einer ambulanten Untersuchung im Rahmen der Erkrankung in zufriedenstellendem Allgemein- und Ernährungszustand. Es fiel eine generalisierte Muskelschwäche, eine geringgradige mimische Schwäche sowie eine follikuläre Hyperkeratose der Arme und Beine auf. Es fanden sich Kontrakturen in der Hüfte, beiden Kniegelenken, in den Sprung- sowie den Ellbogengelenken. Ferner fielen eine Atrophie der kleinen Fingermuskeln und eine deutliche Überstreckbarkeit der Finger auf. Die Muskeleigenreflexe waren nicht auslösbar. Der Hirnnervenstatus und die Sensibilität zeigten keinen pathologischen Befund. Die Arme konnten nicht über den Kopf zusammengeführt werden. Ein alleiniges Aufrichten vom Boden war nicht möglich. Der Patient besuchte eine Körperbehindertenschule. Der CK-Wert war leicht erhöht (162 U/l). Die generalisierte Muskelschwäche, die Kontrakturen und auch die ausgeprägte Minderung der Lungenfunktion lassen eine CMD Ullrich vermuten.

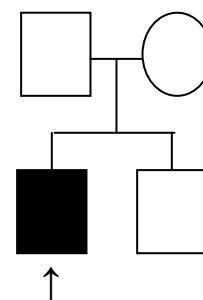
### Patient 139/01

Patient 139/01 ist das zweite Kind gesunder türkischer Eltern, die miteinander verwandt sind. Die Schwangerschaft war unauffällig. Postpartal bestand eine Erb'sche Lähmung rechts sowie eine Fußfehlstellung. Die Familienanamnese ist unauffällig. Sowohl die Eltern als auch der ältere Bruder sind gesund. Bei der U7 fiel eine psychomotorische Retardierung auf. Wegen der Knickfußstellung und einer Außenrotation der Füße wurde das Kind mit einem Jahr stationär vorgestellt. Im Krankenhaus stellte man eine deutliche Muskelhypotonie fest. Es fielen erhöhte CK-Werte und sonographisch Muskelveränderungen auf. Die Meilensteine der Entwicklung wurden deutlich verzögert erreicht. Bei einer ambulanten Vorstellung im März 2003 ließ sich anamnestisch kein Anhalt für eine nächtliche Hypoventilation finden. Bei der klinischen Untersuchung sah man einen fünfjährigen Jungen in gutem Allgemein- und Ernährungszustand mit einer Facies myopathica. Es fiel ein reduzierter Muskeltonus bei schlankem Muskelrelief auf. Der Patient hatte deutliche Genua vara und Pedes planum beidseits. Die Sprunggelenke waren leicht überstreckbar. Es zeigten sich keine Kontrakturen. Außerdem ließ sich ein Beckenschiefstand bei Beinlängendifferenz sowie eine links-konvexe Skoliose feststellen. Vor allem an den Extremitäten-Streckseiten bestand eine follikuläre Hyperkeratose. An der ehemaligen Muskelbiopsie-Stelle fiel deutliches Narbenkeloid auf. Der reduzierte Muskeltonus, die überstreckbaren Gelenke und die Hautveränderungen könnten die Diagnose einer Ullrich CMD möglich machen.



### Patient 60/99

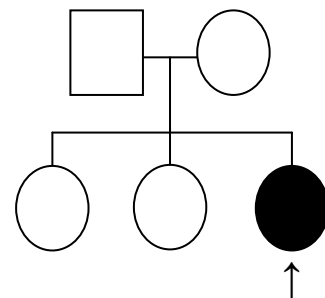
Patient 60/99 ist 1993 nach unauffälliger Schwangerschaft geboren. Die Geburt erfolgte durch Sectio. Nach initialer Sauerstoff-Vorlage war das Neugeborene anschließend unauffällig. Die Eltern sowie der jüngere Bruder sind gesund. Im Alter von vier Wochen trat eine unklare Infektion



mit Fieber auf, in deren Rahmen die CK mit Maximalwerten bis 154 U/l bestimmt wurde. Im Alter von drei Monaten wurde eine Muskelschwäche bemerkt; das Kind hatte Mühe beim Festhalten und Drehen. Freies Sitzen und Laufen wurde zeitgerecht erlernt. Allerdings konnte das Kind nur mittels des Gowers Manöver selbstständig aufstehen. Mit sieben Jahren konnte der Patient auf allen vieren oder mit Geländerhilfe Treppen steigen. Die motorische Entwicklung zeigte bis dahin keine Rückschritte. Da der Patient nicht aus Deutschland kam, lag nur ein Untersuchungsbefund von Oktober 2001 vor. Das Muskelrelief war generell hypotroph. In den oberen Sprunggelenken bestanden Kontrakturen. Eine beginnende rechtskonvexe Skoliose konnte ebenfalls festgestellt werden. Die Flexion der Wirbelsäule war nicht eingeschränkt. Die Fazies war diskret myopathisch, der Lidschluss war jedoch vollständig. Die Untersuchung der Lungenfunktion zeigte weitgehend normale Werte. Neurologisch fiel eine generalisiert herabgesetzte grobe Kraft und ein plumpes, watschelndes Gangbild auf. Rennen, Hackengang sowie monopodales Hüpfen waren nicht möglich. Zweibeiniges Hüpfen konnte nur plump durchgeführt werden. Die kongenitale Muskelschwäche und die Kontrakturen könnten für eine Ullrich CMD sprechen.

### Patient 71/01

Patientin 71/01 ist ein ehemals früh geborenes Kind der 36. Schwangerschaftswoche. Die Geburt erfolgte spontan aus Schädellage, das Geburtsgewicht betrug 2500 g. Postpartal bestanden keine Kontrakturen. Die Eltern der Patientin sind gesund, ebenso ihre zwei älteren



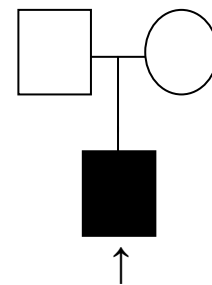
Schwestern. Allerdings leidet die älteste Schwester an einer Skoliose. Die frühen motorischen Meilensteine wurden grenzwertig zeitgerecht erreicht. Sitzen konnte die Patientin zeitgemäß, freies Laufen erlernte sie mit 18 Monaten. Von Beginn des Laufens an bestanden Probleme, sich selbst zum Stand aufzustellen. Daraufhin wurde Krankengymnastik und später ein diagnostisches Vorgehen eingeleitet. Eine Muskelbiopsie ergab die Diagnose einer kongenitalen Muskeldystrophie. Die Patientin konnte bis zum Alter von neun Jahren stetig besser gehen, auch



Treppensteigen war mit Geländerhilfe möglich. Mit 11 Jahren verschlechterte sich das Gangbild bei gleichzeitig zunehmenden Kontrakturen. Seit ihrem 12. Lebensjahr ist die Patientin rollstuhlpflichtig. Bei einer ambulanten Untersuchung im April 2002 zeigte sich ein 13jähriges Mädchen in zufriedenstellendem Allgemeinzustand. Die Unterlider waren leicht ektropioniert; die Wimpern konnten bei Lidschluss nicht vollständig verborgen werden. An den Körperstellen, an denen Operationen oder Biopsien durchgeführt wurden, hatten sich relativ breite Narben gebildet. Es bestanden außerdem Veränderungen der Haut mit prominenten Papillen. An der Wirbelsäule ließ sich eine großbogige, rechts-konvexe BWS-Skoliose feststellen. Kontrakturen bestanden in den Ellbogengelenken, den Handgelenken sowie in den langen Fingerbeugern. Im Stand sah man eine starke Hyperlordose; beide Hüften zeigten ein leichtes Extensionsdefizit. In beiden Kniegelenken bestanden leichte Streckhemmungen. Die Patientin konnte frei sitzen, war aber nicht fähig, die Arme frei über den Kopf anzuheben oder frei zu stehen. Die für UCMD typische Fazies, die multiplen Kontrakturen und die überschießende Narbenbildung sprechen stark für das Vorliegen einer kongenitalen Muskeldystrophie vom Typ Ullrich.

### **Patient 130/01**

Bei Patient 130/01 zeigten sich keine Auffälligkeiten während der Schwangerschaft, die Geburt war eine Zangengeburt. Aufgrund Anpassungsstörungen war das Kind postpartal eine Woche intubiert und wurde daraufhin laut den Eltern „als gesund entlassen“. Freies Laufen

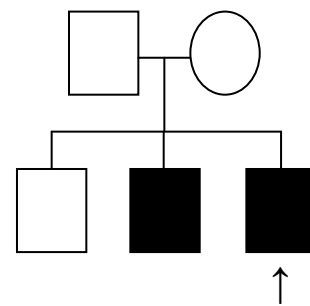


erlernte der Patient mit 18 Monaten. Nach Auskunft der Eltern entwickelte er sich gut weiter. Er konnte allerdings nicht so gut rennen wie andere Kinder und wirkte in der Feinmotorik ungeschickt. Bei einer Untersuchung im September 2003 sah man einen aufgeweckten vierjährigen Jungen in gutem Allgemeinzustand. Es fiel eine Hypersalivation auf. Die Muskelkraft war diskret vermindert. Die linke Körperhälfte wirkte dabei etwas kräftiger als die rechte. Neurologisch fanden sich deutlich überstreckbare Gelenke der Extremitäten; so waren die oberen Sprunggelenke bis ca. 120° überstreckbar. Auch die Hüfte war stark außen und innen rotierbar. Bei den Muskeleigenreflexen reagierte die rechte Körperhälfte fraglich etwas lebhafter

als die linke. Der Patient konnte innerhalb ein bis zwei Sekunden frei vom Boden aufstehen, wobei im Standbild deutlich Knick-Senkfüße sichtbar wurden. Der rechte Fuß wurde mehr in Eversion aufgesetzt und der rechte Arm wurde beim Gehen spontan angewinkelt. Nach Auskunft der Eltern bestanden die diskreten Auffälligkeiten der rechten Seite schon lange. Das Gangbild wirkte etwas unsicher; der Ein-Bein-Stand war nicht möglich. Die motorische und sensible Nervenleitungsgeschwindigkeit waren normal. Die CK war normwertig. Die eher unspezifischen Symptome sprechen nicht sicher für eine Ullrich CMD.

### Patient 02/01

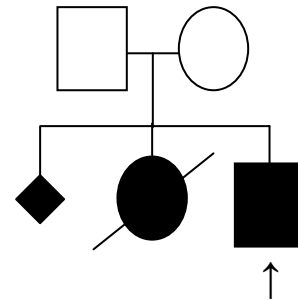
Bei dem Patienten 02/01 gab es keine Auffälligkeiten in der Schwangerschaft. Auch die Geburt war komplikationslos. Er hat zwei jüngere Brüder, von denen einer ebenfalls erkrankt ist. Der jüngste Bruder zeigt keinerlei Symptome. Ab dem 14. Lebensmonat kam es intermittierend zu



Krampfanfällen, die als Fieberkrämpfe eingeordnet worden sind. Bei einer Untersuchung im Rahmen der Abklärung dieser Krämpfe fiel eine erhöhte CK von über 2000 U/l auf. Motorisch konnte keine Einschränkung festgestellt werden. Frei Sitzen konnte der Patient mit acht Monaten, Laufen mit 14 Monaten. Anamnestisch klagte der Patient bei einer ambulanten Untersuchung im März 2003 über regelmäßige Schmerzen in den Waden, vor allem nach Belastung. Die Eltern gaben an, dass der Junge nur eine eingeschränkte Ausdauerfähigkeit besitze. Bei der klinischen Untersuchung sah man einen sieben Jahre alten Jungen in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Es zeigte sich ein deutlich betontes Muskelrelief im Bereich der Extremitäten. Die Muskulatur wirkte im Vergleich zum jüngsten Bruder, der gesund ist, hypertroph. Muskelkraft und Muskeltonus waren altersentsprechend ausgeprägt. Es fanden sich keine Kontrakturen und keine Hyperflexibilität der Gelenke. Es war keine Ataxie und keine Dysmetrie zu sehen. Das Gangbild war unauffällig, der Junge konnte problemlos den Zehenspitzen- und Fersengang durchführen, ebenso wie monopedaless Hüpfen. Die Symptome sprechen eher gegen eine Ullrich CMD.

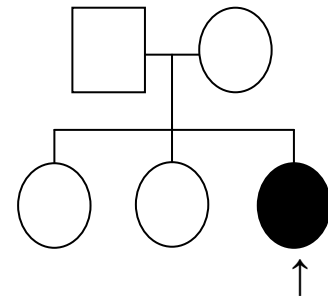
## Patient 11/00

Patient 11/00 kam 1997 zur Welt. Die Schwangerschaft war normal. Aufgrund einer Beckenendlage wurde eine Sectio durchgeführt. Größe und Gewicht des Neugeborenen waren normal. Die Mutter hatte in der Vorgeschichte eine Fehlgeburt erlitten. Die ältere Schwester des Patienten litt an der gleichen Symptomatik und ist im Alter von neun Jahren an einem Atemwegsinfekt plötzlich verstorben. Freies Sitzen erlernte der Patient mit zehn Monaten, das Laufen mit 13 Monaten. Die Sprachentwicklung war unauffällig. Im Februar 2003 wurde aufgrund einer nächtlichen Hypoventilation eine nicht invasive Beatmung begonnen. Im Juni 2003 stellte sich der Patient zur Verlaufskontrolle der Beatmung und zu einer nochmaligen Beurteilung der Spontanatmung im Schlaf stationär vor. Bei der körperlichen Untersuchung sah man einen fast sechsjährigen Jungen in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Die periphere Muskelkraft war relativ gut erhalten. Im thorakolumbalen Übergang konnte man eine linkskonvexe Skoliose sowie ein Rigid-Spine im HWS-Bereich sehen. Es fanden sich keine Kontrakturen. Die oberen Sprunggelenke waren beidseits bis über 90° redressierbar. Muskeleigenreflexe waren nicht auslösbar; die Überprüfung des Hirnnervenstatus ergab keinen pathologischen Befund. Die durchgeführte Polysomnographie zeigte weiterhin eine ausgeprägte REM-Schlaf assoziierte Hypoventilation. Bei Überprüfung der CK-Werte zeigten sich in der Vergangenheit normale oder gering erhöhte Werte. Die Hyperkontraktilität der Sprunggelenke sowie die Hypoventilation könnten für eine Ullrich CMD sprechen, auch wenn keine typischen Symptome wie generalisierte Muskelschwäche oder Kontrakturen vorliegen.



### Patient 45/01

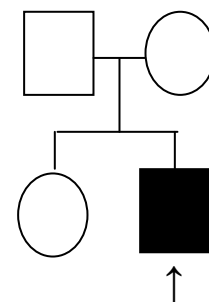
Die Patientin 45/01 lebt nicht bei ihren leiblichen Eltern, sondern bei Adoptiveltern. Ihr Adoptivvater ist der Bruder des leiblichen Vaters. Die Schwangerschaft war komplikationslos verlaufen; die Geburt fand am Termin statt. Laut den Adoptiveltern war die Patientin seit Geburt



schwach und zeigte keine Kopfkontrolle. Mit vier Monaten kam es zu einer Hüftluxation beidseits. Laufen erlernte das Mädchen erst mit ungefähr drei Jahren. Im Alter von acht Jahren kam es zu einer deutlichen Verschlechterung der Kraft mit fast vollständigem Verlust der Gehfähigkeit. Die Kraft in den Armen und im Schultergürtel war gleich geblieben. Im Juni 2003 wurde die Patientin zur Beurteilung der respiratorischen Situation vor geplanter Achillessehnen Operation stationär aufgenommen. Die körperliche Untersuchung zeigte ein elfjähriges rollstuhlpflichtiges Mädchen in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Es fiel eine generalisierte muskuläre Hypotonie und Atrophie auf. In den oberen Sprunggelenken waren Kontrakturen feststellbar. Es bestand eine bikonvexe Skoliose. Die Spirometrie ergab eine schwere restriktive Ventilationsstörung. Die Arme waren bis Kopfhöhe gut anhebbar. Die CK war bei vorherigen Untersuchungen etwas erhöht. Die muskuläre Hypotonie, die Kontrakturen sowie die restriktive Ventilationsstörung könnten für eine Ullrich CMD sprechen.

### Patient 141/01

Die Schwangerschaft war unauffällig. Die Geburt erfolgte in der 38. Schwangerschaftswoche spontan. Dabei war das Neugeborene grenzwertig small for date. Das Geburtsgewicht betrug 2650 g, die Körperlänge 45 cm. Der Patient fiel direkt postpartal durch ein Tetradyrmelie-Syndrom mit

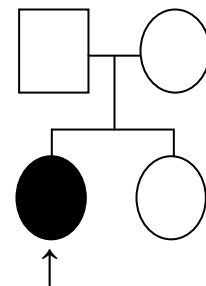


Oligosyndaktylie, bisher als Cenani-Lenz-Dysmelie eingeordnet, auf. Der Patient benötigte postpartal keine Atemhilfe. Eine damals durchgeführte Chromosomenanalyse war nach Angaben der Eltern unauffällig. Aufgrund fehlender Pfannendächer beider Hüften wurde beidseits eine

Umstellungsosteotomie und Pfannendachrekonstruktion durchgeführt. Im sechsten Lebensmonat traten im Anschluss an eine Operation Grand-mal-Anfälle auf, der Patient wurde für 1 ½ Jahre auf Luminal eingestellt. Im vierten Lebensjahr trat ein einmaliger Fieberkrampf auf, seither kam es zu keinen weiteren zerebralen Anfällen. Mit Hilfe eines Schienenapparates erlernte der Patient mit zwei Jahren das freie Gehen. Mit neun Jahren nahm die grobe Kraft ab. 2001 wurde eine Hypoventilationsproblematik festgestellt, weswegen eine BIPAP-Beatmung eingeleitet wurde. Bei einer klinischen Untersuchung im Rahmen einer ambulanten Vorstellung im Juli 2003 sah man einen 18-jährigen Jungen in relativ gutem Allgemeinzustand und etwas reduziertem Ernährungszustand. Neben der bekannten Tetradysmelie fand sich eine großbogige rechtskonvexe Skoliose von mindestens 60° Cobb-Winkel. Der Patient konnte mit Anhalten schräg über die linke Seite noch einige Schritte laufen. Es bestand ein mäßiges Rigid Spine, wodurch die Flexion in der Halswirbelsäule eingeschränkt war. Weitere Kontrakturen bestanden in den Knien, in der Hüfte und in den oberen Sprunggelenken. Echokardiographisch bestand eine Mitralinsuffizienz bei Mitralklappenprolaps. Die Symptome sind eher untypisch für eine Ullrich CMD.

### Patient 55/99

Die Schwangerschaft verlief unauffällig. Die Geburt erfolgte spontan in der 40. Schwangerschaftswoche. Geburtsgewicht und -länge waren normal. Die Eltern der Patientin und ihre jüngere Schwester sind gesund. Die Patientin hatte schon als Baby Probleme, den Kopf zu

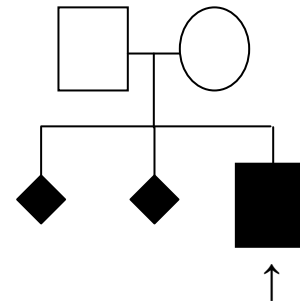


heben und zu drehen. Laut Angabe der Mutter habe sie früher auch nur schwach gesaugt. Freies Sitzen erlernte die Patientin mit acht Monaten, Laufen mit 14 Monaten. In letzter Zeit kam es zu keiner Verschlechterung der Muskelkraft. Die motorischen Fähigkeiten hätten sich laut den Eltern eher gebessert. In der Vergangenheit waren überstreckbare Fußgelenke, eine Hyperlordose und eine steife Körperhaltung beschrieben worden. Im Februar 2003 befand sich die Patientin zur Polysomnographie in stationärer Behandlung. Der körperliche Untersuchungsbefund zeigte ein fünfjähriges Mädchen in gutem Allgemein- und

Ernährungszustand. Die Muskelkraft war relativ gut erhalten, das Muskelrelief stellte sich verschmälert dar. Das Mädchen hatte keine Probleme mit dem Einbeinstand und konnte problemlos hüpfen. Die durchgeführte Spirometrie ergab eine mittelschwere restriktive Ventilationsstörung. Bei der Polysomnographie zeigte sich eine REM-Schlaf bezogene Atemstörung, die zu dem Zeitpunkt aber noch keine nicht-invasive-Beatmung erforderlich machte. Die überstreckbaren Sprunggelenke sowie das verschmälerte Muskelrelief könnten auf eine leichte UCMD hinweisen.

### Patient 120/01

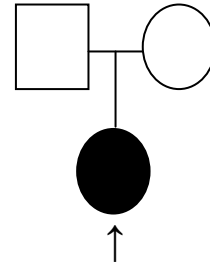
In der Vorgeschichte hatte die Mutter zwei Fehlgeburten. Die Schwangerschaft verlief unauffällig bis zur 27. Schwangerschaftswoche. Dann traten aufgrund einer Placenta praevia Blutungen auf. Die Mutter verbrachte die letzten vier Wochen präpartal stationär im Krankenhaus.



Die Geburt erfolgte durch Sectio starker Blutung. Das Geburtsgewicht betrug 2250 g, die Länge 45 cm. Seit dem dritten Lebensmonat wurde wegen häufiger Kopfseithaltung und möglicherweise auch Muskelhypotonie Krankengymnastik nach Bobath durchgeführt. Der Patient konnte mit 12 Monate frei sitzen; mit 15 Monaten erlernte er Krabbeln. Laufen konnte er mit 20 Monaten. Eine stationäre Vorstellung erfolgte wegen rezidivierend hoher CK-Werte (213-437 U/l). Laut Angabe der Eltern war der Junge muskulär gut belastbar. Es zeigte sich kein Defizit gegenüber Gleichaltrigen. Bei einer Untersuchung im August 2003 sah man einen dreijährigen Jungen in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Das Muskelrelief war normal ausgeprägt; es fanden sich keine spezifischen Defizite. Die Kraft betrug auf allen Etagen 5/5. Zehen- und Hackengang konnten problemlos durchgeführt werden. Die Muskeleigenreflexe waren beidseits regelrecht auslösbar. Es zeigte sich kein Tremor, keine Ataxie und keine Koordinationsstörung. Die Hirnnervenfunktionen waren ohne pathologischen Befund. Die nur geringe muskuläre Symptomatik macht eine CMD vom Typ Ullrich unwahrscheinlich.

### Patient 50/01

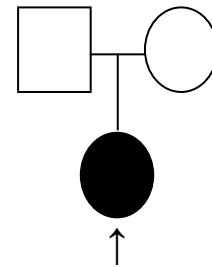
Die Schwangerschaft war unauffällig, das Kind kam nach 38 vollendeten Schwangerschaftswochen auf die Welt. Das Geburtsgewicht betrug 2550 g, die Länge 49 cm. Die postnatale Adaptation war klinisch unauffällig. Die Patientin ist das erste Kind gesunder Eltern. Es bestehen



keine relevanten familiären Erkrankungen. Im Rahmen der U2 wurde eine Dystrophie sowie ein Ikterus neonatorum dokumentiert. Bei der U3 und U4 Untersuchung wurde außer einer leichten Vorzugshaltung über keine relevanten Auffälligkeiten berichtet. Die Eltern berichteten, dass das Stillen von Anfang an schwierig gewesen sei. Das Kind habe nie kräftig geschrien. Im Alter von einem halben Jahr fiel den Eltern zusätzlich eine leichte motorische Verzögerung auf. Die Patientin tolerierte die Bauchlage nicht, hatte viel Mühe sich zu drehen und war deutlich leichter erschöpfbar als gleichaltrige Kinder. Aufgrund einer infektassoziierten respiratorischen Dekompensation, die eine Intubation nötig machte, kam es 2001 zu einem stationären Aufenthalt in einer auswärtigen Klinik. Bei der klinischen Untersuchung fiel ein auffällig geformter Thorax mit leichter Glockenform, ausgeprägter Kyphose der BWS und Hyperlordose der LWS sowie eine Skoliose der thorakolumbalen Wirbelsäule auf. Die Muskulatur war generalisiert hypoton ohne klinisch deutlich abgrenzbare Unterschiede zwischen proximaler und distaler Muskulatur. Die Extremitäten konnten gut gegen die Schwerkraft gehoben werden. Die Muskeleigenreflexe waren lebhaft auslösbar. Die Patientin machte einen wachen Eindruck und zeigte gezieltes sicheres Greifen. Sonographisch und radiologisch fand sich ein extremer Zwerchfellhochstand mit fehlender Nachweisbarkeit einer Eigenmotilität des Zwerchfells. Die CK war normwertig. Die Muskelhypotonie sowie die motorischen Auffälligkeiten könnten auf eine CMD, vielleicht vom Typ Ullrich hinweisen.

### Patient 17/97

Leider war es nicht möglich, Daten zur Langzeitanamnese der Patientin zu bekommen. Die letzte ambulante Vorstellung war im August 2002. Seit der letzten Untersuchung war der Gesamtzustand stabil geblieben. Die Patientin berichtete, dass sie ca. einen Kilometer laufen



könne und sich dann eine starke Muskelschwäche zeige. Muskelschmerzen träten ein- bis dreimal pro Monat auf. Im November 2001 war eine Achillessehnenverlängerung erfolgt, die linksseitig mit Komplikationen und postoperativen Nekrosen behaftet war. Aufgrund einer nächtlichen Hypoventilation erfolgt über Nacht eine nicht-invasive Beatmung. Bei der klinischen Untersuchung zeigte sich ein 15-jähriges Mädchen in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Distal war eine deutliche Muskelatrophie sichtbar. Im Ellbogengelenk fanden sich Kontrakturen von 50° beidseits, die oberen Sprunggelenke waren beidseits bis ca. 10° vor die Nullstellung redressierbar. Die Wirbelsäule war im Lot. Die Patientin konnte breitbasig und sicher laufen, sowie Rumpfbeugen durchführen. Beide Hände konnten über den Kopf gebracht und dort gehalten werden. Zehenstand und monopedaless Hüpfen waren gut durchführbar, der Hackengang gelang nicht. Das freie Aufstehen vom Boden gelang mit dem Gowers'-Phänomen. Die Muskeleigenreflexe waren beidseits nicht auslösbar. Die Muskelatrophie sowie die Kontrakturen in den Ellbogengelenken könnten für eine UCMD sprechen.



Hier Abbildungen zweier Patienten, bei denen aufgrund der klinischen Merkmale die Verdachtsdiagnose UCMD gestellt wurde.



Muskelhypotonie, Skoliose



Hyperflexibilität der distalen Gelenke

**Abbildung 3 Patient 139/01**



Vershmälertes Muskelrelief

**Abbildung 4 Patient 18/01**

## Klinische Daten der Patienten

Patient	54/98	18/01	82/01	117/01	142/01	139/01
Alter bei Biopsie	10 Jahre	2 Jahre	8 Jahre	4 Jahre	9 Jahre	3 Jahre
Familienanamnese	Unauffällig	Onkel diskrete Muskelhypotonie	Bruder ebenfalls betroffen	Unauffällig	2 Aborte in Anamnese	Eltern konsanguin, ges. Bruder
Schwangerschaft und Geburt	Sectio	Unauffällig	Anhydramnion Sectio	Frühgeburt 33. SSW (Neoplasma Cervix)	Sectio	Postpartal Erbsche Lähmung
Größe und Gewicht	56cm, 3940g	51cm, 3100g	50cm, 3130g	49cm, 2330g	54cm, 3880g	53cm, 3070g
Klinische Befunde						
Muskelschwäche und Hypotonie	+	+	+	+	+	+
Kontrakturen	S,E,K	-	S,E,K	H, K, S	H, K, S, E	-
Lungenfunktion	↓	Unauffällig	Unauffällig	Hohe Infektanfälligkeit	Restriktive Ventilationsstörung	Unauffällig
Torticollis	+	+	+	-	+	-
Skoliose	+	+	+	-	+	+
distale Hyperlaxibilität	-	+	-	-	+	+
Gesichtsmuskulatur	Diskrete Ptosis Lidschlußschwäche	Schwäche der Unterlider	Facies myopathica	Facies myopathica	Diskrete mimische Schwäche	Facies myopathica
RSS	-	+	-	-	+	-
CK	Normwertig	103U/l	Normwertig	148U/l	Bis 160U/l	192 U/l
Sonstiges		Follikuläre Hyperkeratose	Xerodermie, Knick-Senkfüße		Follikuläre Hyperkeratose	Follikuläre Hyperkeratose Narbenkeloide
Meilensteine der Entwicklung						
Sitzen	Verzögert	10 Monate	6 Monate	12 Monate	Unauffällig	Verzögert
Laufen	21 Monate	18 Monate	12 Monate	Nicht möglich	Unauffällig	Nicht möglich
Sonstiges	Gehen nur bis 200m	Gowers-Manöver Watschelgang	Seit 7. LJ Gehfähigkeit↓, Gehstrecke 10m		Verlust der Gehfähigkeit mit 6 Jahren	
Intellektuelle Entwicklung	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Mental leicht reduziert	Unauffällig
Neurologischer Status	Unauffällig	Unauffällig	MER schwach auslösbar	MER nicht auslösbar	MER nicht auslösbar	Unauffällig

Patient	60/99	71/01	130/01	11/00	02/01	45/01
<b>Alter bei Biopsie</b>	6 Jahre	12 Jahre	2 Jahre	2 Jahre	5 Jahre	9 Jahre
<b>Familienanamnese</b>	Unauffällig	Ältere Schwester Skoliose	Unauffällig	Ältere Schwester betroffen, †	Jüngerer Bruder gleiche Symptomatik	Unauffällig
<b>Schwangerschaft und Geburt</b>	Sectio	Frühgeburt 36. SSW	SS unauffällig, postpartal 1 Woche intubationspflichtig	Sectio aufgrund Beckenendlage	Unauffällig	Unauffällig
Größe und Gewicht	3330g	2500g	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	50cm, 2750g
<b>Klinische Befunde</b>						
Muskelschwäche und Hypotonie	+	+	+	-	-	+
Kontrakturen	S	E, Ha, H, K	-	-	-	S
Lungenfunktion	Unauffällig	Schwere restriktive Ventilationsstörung	Unauffällig	nächtliche Hypoventilation	Unauffällig	Schwere restriktive Ventilationsstörung
Torticollis	-	-	-	-	-	-
Skoliose	+	+	-	+	-	+
distale Hyperlaxibilität	-	-	+	-	-	-
Gesichtsmuskulatur	Diskrete Facies myopathica	Facies myopathica	Unauffällig	Unauffällig	-	Unauffällig
RSS	-	-	-	+ im Halsbereich	-	-
CK	Bis 154U/l	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Im Fieberkrampf bis 2000U/l, sonst normal	Unauffällig
Sonstiges		+ Bethlem Zeichen	Knick-Senkfüße	Periphere Muskelkraft gut erhalten	Betontes Muskelrelief	
<b>Meilensteine der Entwicklung</b>						
Sitzen	Zeitgerecht	Zeitgerecht	Zeitgerecht	10 Monate	8 Monate	
Laufen	Zeitgerecht	18 Monate	18 Monate	13 Monate	14 Monate	Ca. 3 Jahre
Sonstiges		Mit 12 Jahren Verlust der Gehfähigkeit				Mit 8 Jahren Verlust der Gehfähigkeit
<b>Intellektuelle Entwicklung</b>	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig
<b>Neurologischer Status</b>	Unauffällig	MER nicht sicher auslösbar	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig

Patient	141/01	55/99	120/01	50/01	17/97
<b>Alter bei Biopsie</b>	6 Jahre	2 Jahre	1 Jahr	1 Jahr	
<b>Familienanamnese</b>	Unauffällig	Unauffällig	2 Aborte in Anamnese	Unauffällig	?
<b>Schwangerschaft und Geburt</b>	Unauffällig	Unauffällig	Sectio bei Plazenta praevia	Unauffällig	?
Größe und Gewicht	45cm, 2650g	51cm, 3100g	45cm, 2250g	49cm, 2550g	?
<b>Klinische Befunde</b>					
Muskelschwäche und Hypotonie	+	(+)	-	+	+
Kontrakturen	H, K, S	-	-	-	E, S
Lungenfunktion	Hypoventilation, nächtlich BIPAP	Nächtliche Hypoventilation	Unauffällig	Z.n. infektbedingter resp. Dekompensation	Nächtliche Hypoventilation, BIPAP
Torticollis	-	-	-	-	-
Skoliose	+	-	-	+	-
distale Hyperlaxibilität	-	+	-	-	-
Gesichtsmuskulatur	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig
RSS	+	+	-	-	-
CK	199-489U/l	Unauffällig	213-437 U/l	95U/l	Unauffällig
Sonstiges	Komplexe Dysmelie aller 4 Gliedmaßen	Hyperlordose, steife Körperhaltung	Muskelrelief normal ausgeprägt, Kraft normal	Zwerchfellhochstand, Glockenform des Thorax	
<b>Meilensteine der Entwicklung</b>					
Sitzen		8 Monate	12 Monate	Etwas verzögert	
Laufen	2 Jahre	14 Monate	20 Monate	Etwas verzögert	
Sonstiges					
<b>Intellektuelle Entwicklung</b>	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig
<b>Neurologischer Status</b>	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig	Unauffällig

**Tabelle 3 klinische Daten der Patienten**

RSS: Rigid Spine Syndrom

Kontrakturen: S-Sprunggelenk, K-Knie, H-Hüfte, Ha-Hand, E-Ellbogen

CK: Kreatin-Kinase (Normwert je nach Labor 150-200U/l)

## 2.2 Muskel

### 2.2.1 Gewebeaufbereitung

Nach der Entnahme des Muskels erfolgt die direkte Weiterverarbeitung.

Tragant Pulver (Merck 8405) wird mit Aqua dest. angerührt und gut vermischt. Anschließend lässt man das Pulver quellen, bis die Masse homogen ist. Die Konsistenz sollte nicht zu fest und nicht zu flüssig sein, je nachdem muss noch Tragant bzw. Aqua dest. hinzu gegeben werden. Die Tragantmasse kann man portionieren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern. Nach dem Auftauen sollte sie im Kühlschrank aufbewahrt werden. Auf einem Korkplättchen wird ein Kegel aus Tragant geformt. Der Muskel wird in das Tragant eingebettet, je nach gewünschter Orientierung längs oder quer. Ca. 150 ml Isopentan werden in ein Becherglas geschüttet und in einem Dewargefäß, welches zu ca.  $\frac{1}{4}$  mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist, so lange vorgekühlt, bis es nicht mehr dampft und der Boden des Becherglases vereist ist. Der eingebettete Muskel wird in dem Isopentan 20 s unter leichter Bewegung schockgefroren. Man benutzt Isopentan statt Stickstoff, da dieses im Gegensatz zu direktem Kontakt mit Stickstoff Gefrierartefakte vermeidet.

### 2.2.2 Schneiden der Muskelpräparate

Mit einem Mikrotom der Marke Jung Frigocut 2800E ( $-21^{\circ}\text{C}$ ; Leica) werden zunächst  $10\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte werden HE gefärbt (Hämalaun-Eosin) und unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Für die Immunfluoreszenzfärbung werden ca.  $6\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf spezielle Objektträger (Super Frost/Plus; Menzel-Gläser; Art. Nr. 041300) transferiert. Auf einem Objektträger befinden sich nach dem Schneiden ca. fünf Muskelschnitte: eine Normalkontrolle und mehrere Schnitte von verschiedenen Patienten. Nun erfolgt entweder die Zwischenlagerung der Objektträger bei  $-70^{\circ}\text{C}$  oder die Immunfluoreszenz.

### **2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Diese Färbung ist eine einfache, rasch auszuführende Übersichtsfärbung. Hierbei werden die Muskelschnitte zuerst fünf Minuten in Mayers Saures Hämalaun (Merck 1.90249) zur Kernfärbung eingestellt. Mayers Hämalaun färbt rasch, ohne zu überfärben. Die Bereitung erfolgt aus Hämatoxylin mit Natriumjodat als Oxidationsmittel. Nach der Hämalaun-Färbung spült man die Schnitte in Aqua dest und bläut anschließend zehn Minuten in fließendem Leitungswasser. Daraufhin werden die Präparate zwei Minuten in Eosin gefärbt und ein bis fünf Minuten in Wasser ausgewaschen. Nächster Schritt ist, die Muskelschnitte in eine aufsteigende Alkohol-Reihe einzustellen (jeweils 30 Sekunden bis eine Minute 96%-96%-100%-100%-Xylol-Xylol). Zum Schluss werden die Präparate mit Eukitt eingedeckt. Die Färbung zeigt Zellkerne blau, alles Übrige in Tonabstufungen rot.

### **2.2.4 Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten**

Falls die Gewebeschnitte zwischengelagert waren, müssen sie erst sorgfältig auftauen und trocknen, bevor die Weiterverarbeitung erfolgt. Zuerst verdünnt man die primären Antikörper in PBS (phosphate buffered saline) / 1% BSA (Bovines Serum Albumin). Zur Herstellung von PBS werden auf 1 l Aqua dest. 7,01 g NaCl (Merck 6404), 1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  (Merck 6346) 5,44 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck 5102) aufgelöst. Der pH Wert wird mit 1N NaOH auf 7,5 eingestellt. Diese Lösung wurde auch für die Waschvorgänge verwendet. Auf jeden Gewebeschnitt werden ca. 50  $\mu\text{l}$  Antikörper-Verdünnung pipettiert. Mit der Pipettenspitze wird der Tropfen ganz vorsichtig auf dem Schnitt verteilt, ohne dass die Spitze das Muskelgewebe berührt. Dann erfolgt für 90 Minuten die Inkubation bei 37°C. Diese findet in einer feuchten Kammer statt, um der Verdunstung der Antikörper vorzubeugen. Anschließend werden die Objektträger 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Dadurch werden ungebundene Antikörper entfernt. Zum letzten Waschschriff werden ca. 10 ml BSA hinzugegeben, damit vermeidet man eine unspezifische Hintergrundfärbung durch Abblocken unspezifischer Bindungsstellen. Dann trocknet man vorsichtig die Bereiche um die Schnitte herum mit einem Papiertuch (Kleenex). Nun werden die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper aufgetragen und für eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert

(dunkel!), danach gewaschen (s.o.). Die Objektträger werden mit Aquatex oder Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckt und im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.5 Primäre Antikörper**

Da die Patienten an einer bisher molekular nicht eindeutig gesicherten kongenitalen Muskeldystrophie leiden, wurden verschiedene Routine-Antikörper bei der Immunfluoreszenz zur differentialdiagnostischen Abklärung verwandt.

Eine verminderte Anfärbbarkeit mit einem oder mehreren Collagen VI-Antikörpern kann auf eine Ullrich kongenitale Muskeldystrophie oder eine Bethlem Myopathie hinweisen.

Dystrophin 1, 2 und 3 sind Marker für eine Duchenne oder eine Becker Muskeldystrophie.

Utrophin ist ein Dystrophin-Analogon, welches bei der Duchenne Muskeldystrophie verstärkt im Sarkolemma zu finden ist.

$\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglycan sind Proteine, die den kontraktilel Apparate mit der Extrazellulär-Matrix verbinden.  $\alpha$ -Dystroglycan kann bei bestimmten Muskeldystrophien sekundär vermindert sein.

Eine Familie von Transmembranproteinen, die Sarcoglycane, werden bei den Gliedergürteldystrophien vermindert exprimiert.

Laminine bestehen aus einer schweren ( $\alpha$ ) und einer leichten Kette ( $\beta$  und  $\gamma$ ). Die verminderte Anfärbbarkeit von Laminin  $\alpha 2$  ist typisch für die  $\alpha 2$ -Laminopathien (Merosinopathien). Laminin  $\alpha 5$  hat strukturelle Ähnlichkeiten mit Laminin  $\alpha 2$  und wird bei verschiedenen  $\alpha 2$  -Laminopathien oft unspezifisch hochreguliert. Es kann aber nicht die Funktion von Laminin  $\alpha 2$  übernehmen.

Emerin und Lamin A/C werden gefärbt, um eine eventuelle Emery-Dreifuß-Muskeldystrophie zu zeigen.

Antikörper	Vertrieb durch	Bestellnummer	Verdünnung	sek. AK conj.
Collagen VI	Chemicon	MAB 1944	1:500	mouse-Ig
Collagen VI	Chemicon	MAB 3303	1:100	mouse-Ig
Collagen VI	Geschenk R.Timpl		1:1000	rabbit-Ig
Caveolin 3	Transduction Laboratories	C 38320	1:500	mouse-Ig
Dystrophin 1	Medac	NCL-DYS 1	1:5	mouse-Ig
Dystrophin 2	Medac	NCL-DYS 2	1:50	mouse-Ig
Dystrophin 3	Medac	NCL-DYS 3	1:100	mouse-Ig
Utrophin, DRP2	Medac	NCL-DRP2	1:5	mouse-Ig
$\alpha$ -Dystroglycan	Geschenk S. Schröder		1:500	sheep-Ig
$\beta$ -Dystroglycan	Medac	NCL-b-DG	1:10	mouse-Ig
$\alpha$ -Sarcoglycan	Medac	NCL-a-SARC	1:100	mouse-Ig
$\beta$ -Sarcoglycan	Medac	NCL-b-SARC	1:50	mouse-Ig
$\gamma$ -Sarcoglycan	Medac	NCL-g-SARC	1:100	mouse-Ig
$\delta$ -Sarcoglycan	Medac	NCL-d-SARC	1:10	mouse-Ig
Laminin $\alpha$ 2-C-terminal ("Merosin"; 80 kDa)	Chemicon	MAB 1922	1:500	mouse-Ig
Laminin $\alpha$ 2-N-terminal (4H8-2; 300 kDa)	Alexis Biochemicals	804-190-C100	1:5	rat-Ig
Laminin $\beta$ 1	Chemicon	MAB 1921	1:500	mouse-Ig
Laminin $\beta$ 2	Chemicon	MAB 1920	1:50	mouse-Ig
Laminin $\gamma$ 1	Chemicon		1:5000	mouse-Ig
Laminin $\alpha$ 5	Chemicon	MAB 1924	1:500	mouse-Ig
Emerin	Medac	NCL-Emerin	1:40	mouse-Ig
Lamin A/C	Medac	NCL-LAM-A/C	1:100	mouse-Ig

Ig: Immunglobulin, MAB: monoclonal antibody, sek. AK conj.: sekundäre Antikörper konjugiert

Tabelle 4 Liste der primären Antikörper



### **2.2.6 Sekundäre Antikörper**

Die sekundären Antikörper stammen allesamt von der Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories. Es handelt sich dabei entweder um Rhodamine Red-X-konjugierte oder Texas Red-konjugierte Antikörper. Die Verdünnung beträgt jeweils 1:200.

Es handelt sich dabei im speziellen um:

Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Mouse Anti-Rat IgG Code-Number 212-295-102

Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG Code-Number 115-295-062

Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG Code-Number 111-295-045

Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG Code-Number 305-295-045

Texas Red-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG Code-Number 112-075-071

Texas Red-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG Code-Number 115-075-062

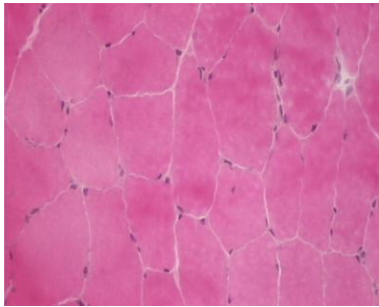
Texas Red-conjugated AffiniPure Mouse Anti-Rat IgG Code-Number 212-075-062

### **2.2.7 Mikroskopieren und Bilderfassung**

Die gefärbten Muskelschnitte werden mit einem Mikroskop der Marke Zeiss Axioplan, ausgerüstet für Fluoreszenz, bei 100-facher und 200-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert (Kleinbildkamera MC-80 von Zeiss). Mittels einer 3CCD-Farb-Video Kamera der Firma AVT Horn konnten die Bilder auf einen PC transferiert und dort gespeichert werden.

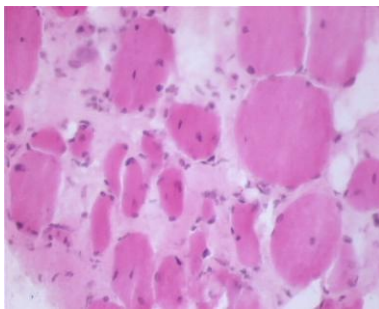
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung



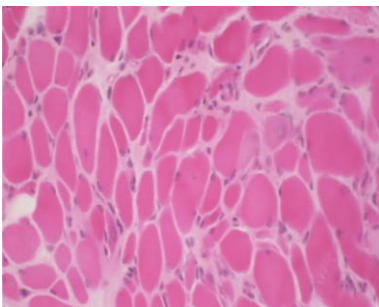
Normalkontrolle

In der Normalkontrolle sieht man gleichmäßige, polygonale Muskelfasern. Die Kerne liegen subsarkolemmal. Die Fasern sind beieinander, das Endomysium ist schmal zu erkennen. Um die Fasern befinden sich Kapillaren, daher klaffen die Fasern an den Eckbereichen etwas auseinander.



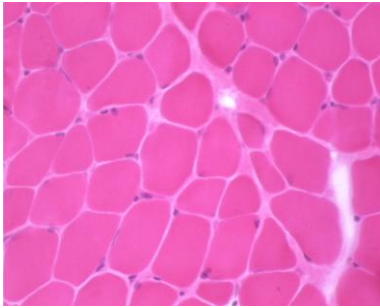
Patient 54/98

Die Muskelfasern dieses Patienten zeigen enorme Kaliberschwankungen. Das endomysiale Bindegewebe ist deutlich vermehrt. Des Weiteren sieht man Fett-Vakat-Wucherungen. Die Zellkerne liegen nicht nur sarkolemmal, sondern auch zentral. Dieses Bild zeigt ein klassisches Beispiel für einen dystrophischen Muskel.



Patient 18/01

In dem histologischen Bild dieses Muskels kann man deutliche Kaliberschwankungen erkennen. Das endomysiale Bindegewebe zeigt eine beginnende Vermehrung. Einige Zellkerne sind zentralständig. Die Veränderungen sind dystrophisch, aber noch nicht zum Vollbild ausgeprägt.



Patient 11/00

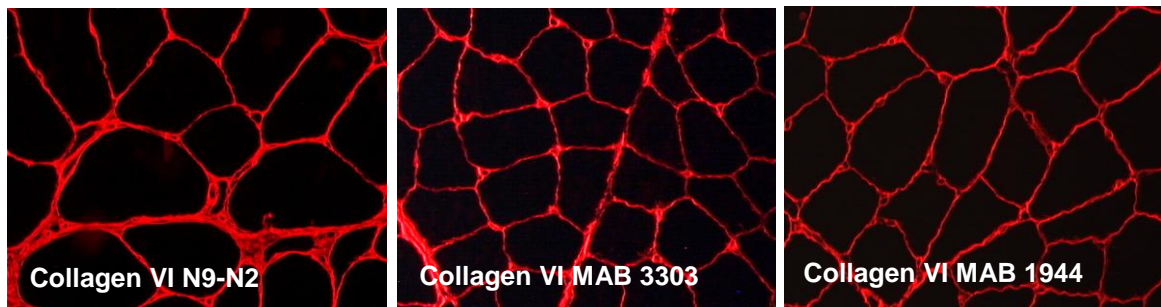
Die Form der Muskelfasern ist regelrecht, es finden sich nur geringe Kaliberdifferenzen. Man kann eine Teil-Atrophie einzelner Fasern beobachten. Die Zellkerne liegen sarkolemmal. Es findet sich eine leichte aber eindeutige endomysiale Fibrose. Dieses Muskelgewebe ist vom histologischen Aspekt her nur gering betroffen.

Erläuterungen zu den Bilddokumentationen: Vergrößerung 100-fach

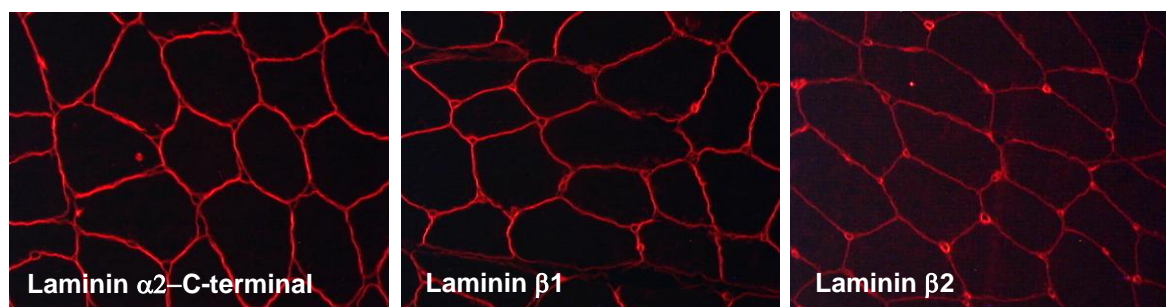
### 3.2 Immunfluoreszenzfärbung

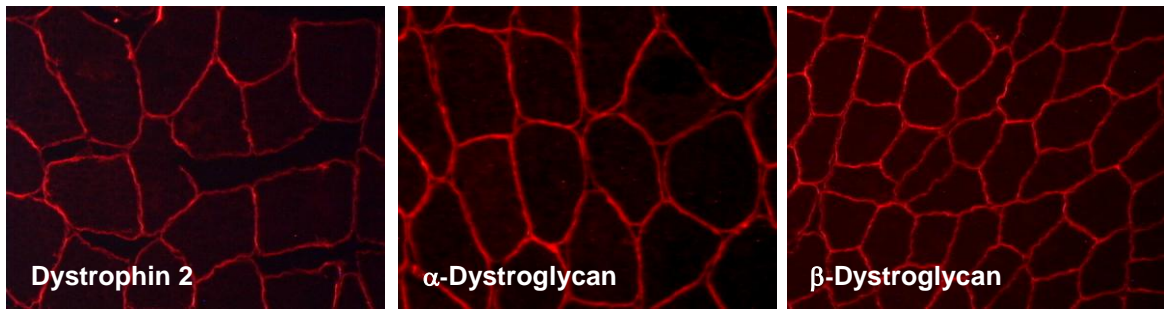
Nachfolgend aufgelistet finden sich die wichtigsten Antikörper, die in der Immunfluoreszenz-Färbung verwendet wurden. Die Antikörper färben unterschiedliche subzelluläre Komponenten an.

Die Kollagen VI Antikörper zeigen eine Färbung der Basalmembranen, des endomysialen und perimysialen Bindegewebes.

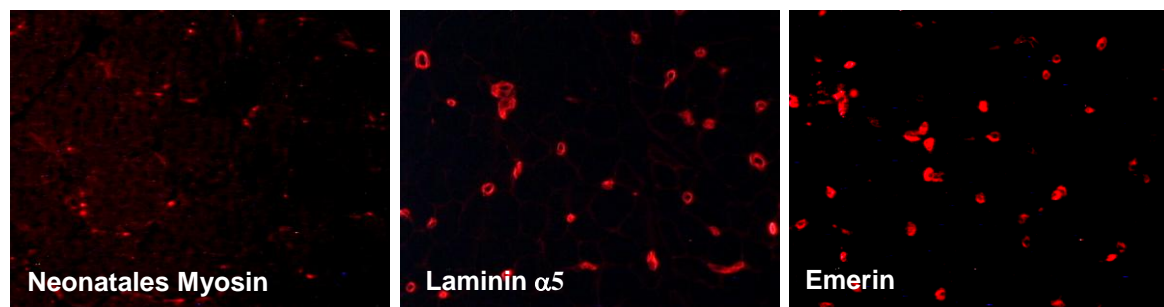


Die Laminine, Sarcoglycane, Dystroglycane, Dystrophin und Caveolin färben das Sarkolemma an. Laminin  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 2$  zeigen zusätzlich noch eine Anfärbung der Gefäße.





Neonatales Myosin wird in gesundem, reifem Muskel normalerweise nur gering exprimiert. Die positive Anfärbung von diesem Protein ist ein Zeichen für regenerierende Muskelfasern. Laminin  $\alpha 5$  färbt in normalen Muskel nur die Gefäße, in pathologisch veränderten Muskeln auch sarkolemmale Bereiche an. Emerin wird physiologischer weise im reifen Skelettmuskel in den Zellkernen exprimiert. Es färbt weder das Bindegewebe noch sarkolemmale Strukturen an.

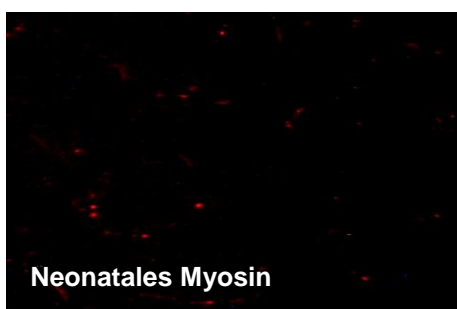
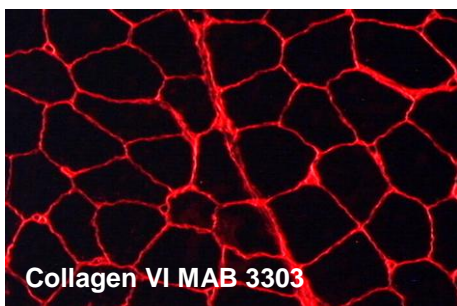
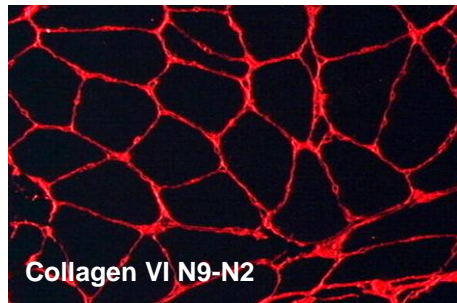


Erläuterungen zu den Bilddokumentationen: Vergrößerung jeweils 100-fach

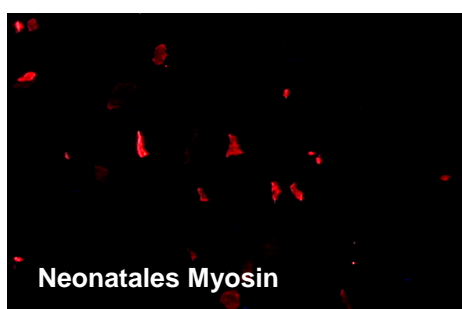
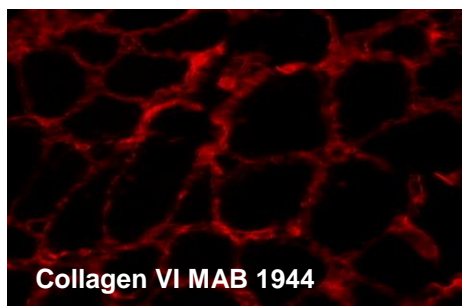
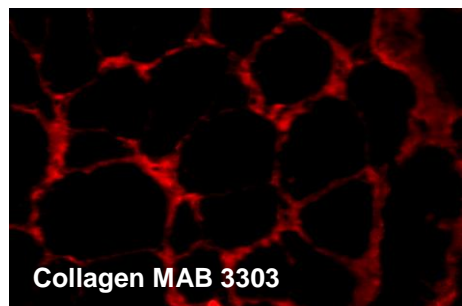
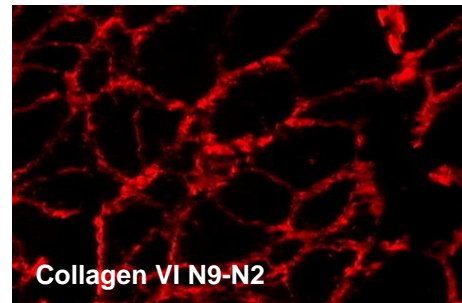


Nachfolgend sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung von Kollagen VI einiger Patienten exemplarisch abgebildet.

#### **Normalkontrolle**



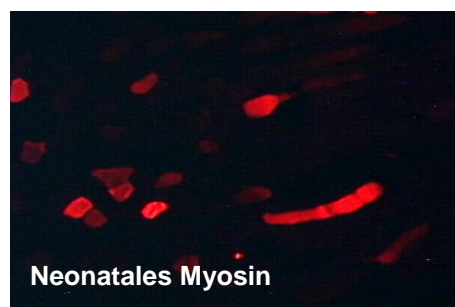
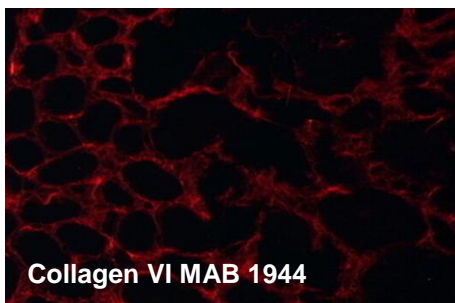
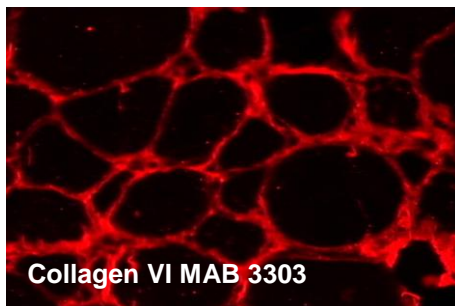
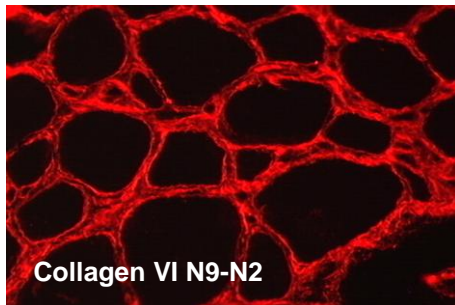
#### **Patient 54/98**



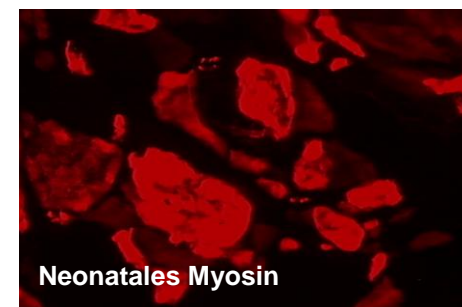
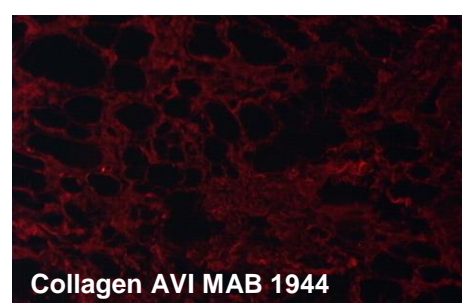
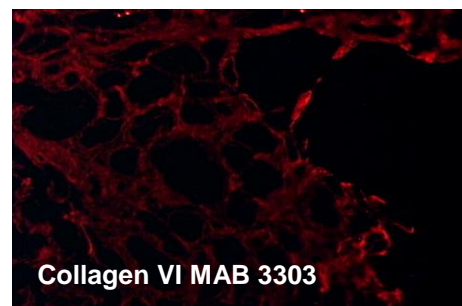
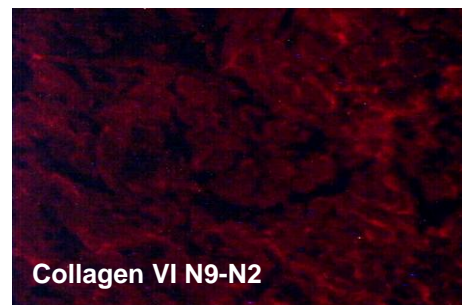
Bei Patient 54/98 zeigen die drei Kollagen VI Antikörper N9-N2, MAB 3303, MAB 1944 eine deutlich verminderte und unregelmäßige Anfärbung im Gegensatz zur Normalkontrolle. Die einzelnen Muskelfasern sind nicht so deutlich sichtbar wie in normalem Muskel. Einige Bereiche des Endo- und Perimysiums scheinen

verstärkt angefärbt zu sein. Neonatales Myosin zeigt eine vermehrte Expression. Vor allem sind kleinere, regenerierende Fasern angefärbt.

**Patient 60/99**



**Patient 117/01**



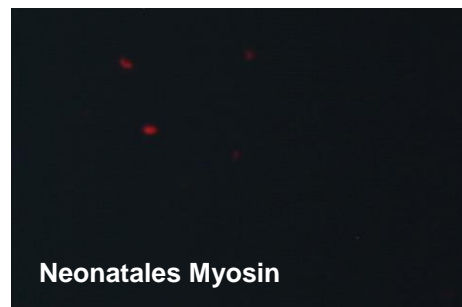
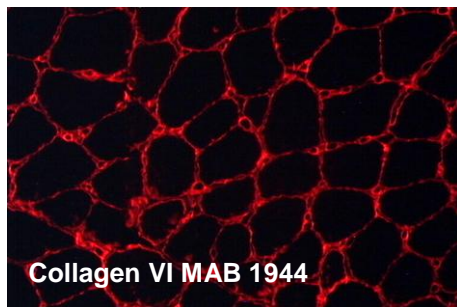
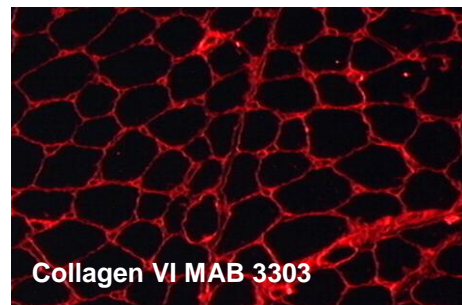
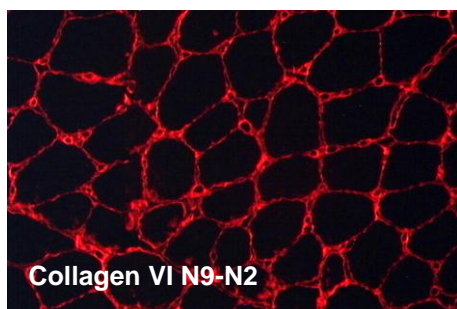
Im Muskelgewebe von Patient 60/99 zeigen die Kollagen VI Antikörper N9-N2 und MAB 3303 eine normale Expression von Kollagen VI. Bei der Färbung mit dem Antikörper N9-N2 sieht man deutlich, dass das vermehrte endomysiale

Bindegewebe gleichmäßig und kräftig angefärbt ist. Der Kollagen VI Antikörper MAB 1944 färbt die Muskelfasern und das Bindegewebe nur inhomogen und schwach an. Neonatales Myosin wird überexprimiert, ungefähr 15 von 50 Fasern zeigen eine Anfärbung.

Patient 117/01 weist bei der Färbung mit allen Kollagen VI Antikörper eine sehr deutlich verminderte und inhomogene Anfärbung der Muskelfasern auf. Das Bindegewebe scheint vermehrt zu sein. Neonatales Myosin wird deutlich überexprimiert (über 50% der Fasern zeigen eine vermehrte Anfärbbarkeit).

Erläuterungen zu den Bilddokumentationen: Vergrößerung jeweils 100-fach

#### **Patient 11/00**



In den Muskelfasern von Patient 11/00 wird Kollagen VI normal exprimiert, wie die Färbung mit den drei verschiedenen Kollagen VI Antikörpern zeigt. Die Basalmembranen der Muskelfasern und die extrazelluläre Matrix sind gleichmäßig und kräftig angefärbt. Neonatales Myosin wird nicht überexprimiert.

Erläuterungen zu den Bilddokumentationen Patient 11/00: Vergrößerung 40-fach

Zum besseren Verständnis wurden die Ergebnisse der Immunfluoreszenz in einer Liste tabellarisch zusammengefasst.

Patient	54/98	82/01	117/01	139/01	142/01	60/99	18/01
Collagen VI N9-N2	-	-	-	-	-	+	-
Collagen VI MAB 3303	-	-	-	-	-	+	+
Collagen VI MAB 1944	-	-	-	-	-	-	-
Neonatales Myosin	++	++	++	(+)	++	++	++
Laminin $\alpha 5$	O	O	(+)	O	O	(+)	O
Laminin $\alpha 2$ C-terminal	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\alpha 2$ 300kDa	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\beta 1$	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\beta 2$	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\gamma$	+	+	+	+	+	+	+
Caveolin	+	+	+	+	+	+	+
Dystrophin 1	+	+	+	+	+	+	+
Dystrophin 2	+	+	+	+	+	+	+
Dystrophin 3	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Dystroglycan	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Dystroglycan	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+
$\gamma$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+
$\delta$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+
Emerin	+	+	+	+	+	+	+
Lamin A/C	+	+	+	+	+	+	+

+ normale Expression   (+) partielle Expression   - verminderte Expression   o keine Expression   ++ Überexpression



Patient	71/01	130/01	02/01	11/00	45/01	141/01	55/99	120/01	50/01	17/97
Collagen VI N9-N2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Collagen VI MAB 3303	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Collagen VI MAB 1944	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neonatales Myosin	(+)	(+)	++	O	++	++	+	++	++	++
Laminin $\alpha$ 5	O	O	(+)	O	O	(+)	O	(+)	O	O
Laminin $\alpha$ 2 C-terminal	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\alpha$ 2 300kDa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\beta$ 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\beta$ 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laminin $\gamma$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caveolin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dystrophin 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dystrophin 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dystrophin 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Dystroglycan	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Dystroglycan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\gamma$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\delta$ -Sarcoglycan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Emerin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lamin A/C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ normale Expression (+) partielle Expression - verminderte Expression o keine Expression ++ Überexpression

**Tabelle 5 Ergebnisse der Immunfluoreszenz**

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassende Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Charakterisierung von 17 Patienten, die an einer bislang unklaren Muskeldystrophie leiden, mithilfe der Immunfluoreszenz von Muskelbiospien unter besonderer Berücksichtigung der Kollagen VI-Expression vorgenommen. Für die Immunfluoreszenz standen drei verschiedene Kollagen VI Antikörper zur Verfügung: Kollagen VI MAB 3303 und Kollagen VI MAB 1944 der Firma Chemicon sowie ein Kollagen VI-Antikörper Collagen VI N9-N2, den Herr R. Timpl (Basel) zur Verfügung gestellt hat.

Sieben der 17 Patienten (41,1%) weisen einen Kollagen VI Mangel bei der Färbung mit Kollagen VI-Antikörpern (s. Tabelle) auf. Davon fällt bei fünf Patienten (29,4%) eine verminderte Anfärbung aller drei Antikörper auf, zwei Patienten (11,7%) zeigen eine verminderte Anfärbung eines oder zweier Kollagen VI-Antikörper. Bei einem Patienten (71/01; 5,8%) wurde aufgrund der klinischen Merkmale die Diagnose UCMD gestellt, die Expression von Kollagen VI im Muskelgewebe in der Immunfluoreszenz ist unauffällig.

Anhand dieser Erkenntnisse sind acht Patienten an einer Ullrich Muskel-Dystrophie erkrankt, sieben (85%) wurden anhand der Immunfluoreszenzfärbung mit verschiedenen Kollagen VI-Antikörpern detektiert.

Man kann drei klinische Gruppen der Patienten mit UCMD bilden: Die erste Gruppe weist eine verminderte Anfärbbarkeit aller drei Kollagen VI Antikörper auf, in der zweiten Gruppe werden nur ein oder zwei Antikörper vermindert angefärbt und in der dritten Gruppe ist die Immunfluoreszenz aller drei Kollagen VI-Antikörper unauffällig.

Als Hauptziel dieser Arbeit galt es herauszufinden, ob die Immunfluoreszenzfärbung mit Kollagen VI-Antikörpern als Screening-Methode für eine UCMD geeignet ist. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Immunfluoreszenz Rückschlüsse auf das klinische Erscheinungsbild zulässt.

Es wurde also untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Klinik und unterschiedlichen Ergebnisse in der Immunfluoreszenz-Färbung mit den verschiedenen Antikörpern besteht.

Aus der Gruppe zwei (Patienten mit einer verminderten Anfärbung nur eines oder zweier Kollagen VI-Antikörper) zeigt ein Patient (60/99) lediglich eine verminderte Anfärbbarkeit von Kollagen VI mit dem Antikörper MAB 1944, die Färbung mit den Antikörpern MAB 3303 und N9-N2 ist unauffällig. Klinisch stellt sich der Patient in einem stabilen Allgemeinzustand dar. Es fällt eine generalisierte Muskelhypotonie auf. Der Patient ist fähig, selbstständig zu laufen, zeigt allerdings ein plumpes, watschelndes Gangbild. Darüber hinaus bestehen Kontrakturen in den oberen Sprunggelenken sowie eine beginnende Skoliose der Brustwirbelsäule. Bei diesem Patienten gehen wir davon aus, dass ein primärer Defekt im Kollagen VI besteht. Es empfiehlt sich jedoch, weiterführende molekularbiologische Untersuchungen vorzunehmen, um den ursächlichen Defekt aufzuzeigen. Es handelt sich entweder um eine rezessiv vererbte, relativ milde Form der Ullrich Dystrophie oder, falls eine dominante Mutation vorliegt, um eine Bethlem Myopathie (wobei mittlerweile auch dominante de novo Mutationen bei UCMD beschrieben wurden. (Baker et al., 2005; Pan et al., 2003)). Allerdings ist anzumerken, dass bei Patienten mit Bethlem Myopathie die Immunfluoreszenzfärbung mit verschiedenen Kollagen VI-Antikörpern gewöhnlich normal ist und für diagnostische Verfahren nicht genutzt werden kann (Lampe, Bushby, 2005).

Ebenfalls aus der Gruppe zwei ist ein Patient 18/01. Die Färbung mit dem Antikörper MAB 3303 ist unauffällig, wohingegen bei der Färbung mit den Antikörpern MAB 1944 und N9-N2 die Muskelschnitte eine verminderte Anfärbbarkeit von Kollagen VI zeigen. Der Patient stellt sich in einem im Rahmen seiner Grundkrankheit stabilen Allgemeinzustand vor. Es fällt eine generalisierte muskuläre Hypotonie auf. Ferner zeigt sich eine Rigidität der Wirbelsäule (Rigid spine Syndrom). Es besteht eine Hyperlaxibilität der distalen Gelenke. Der Patient kann selbstständig laufen (breitbeiniges, watschelndes Gangbild).

Bei diesem Patienten wurde aufgrund der klinischen Symptome und dem Ergebnis der Immunfluoreszenz ebenfalls die Diagnose einer UCMD gestellt.

Aus der Gruppe 1 (Patienten mit einer verminderten Anfärbbarkeit aller drei Kollagen VI Antikörper) ist Patient 54/98. Der Patient weist eine generalisierte muskuläre Hypotonie auf. Freies Sitzen ist möglich, Gehen mit Unterstützung bis 300 m. Es fällt ein Torticollis sowie Kontrakturen in den Ellbogengelenken, Kniegelenken und Sprunggelenken auf. Es besteht eine restriktive Ventilationsstörung; eine nächtliche Bipap-Beatmung ist indiziert. In der Immunfluoreszenz fällt ein deutlicher Mangel an Kollagen VI in der Färbung mit allen drei Kollagen VI Antikörper auf. Bei Patient 54/98 wurde aufgrund der eindeutigen Klinik und der Immunfluoreszenz-Färbung die Diagnose einer UCMD gestellt.

Aus diesen Beschreibungen ergibt sich zunächst der Verdacht, dass Patienten mit einer verminderten Anfärbbarkeit von nur einem oder zwei Antikörpern in der Immunfluoreszenz klinisch ein milderes Erkrankungsbild aufweisen als Patienten mit einer verminderten Anfärbbarkeit aller drei Kollagen VI Antikörper (Patient 18/01 und 60/99 können beide eigenständig laufen, Patient 54/98 weist klinisch deutlich progredientere Symptome auf).

Diese These wird jedoch widerlegt durch Patient 71/01, bei dem die Immunfluoreszenz aller drei Antikörper vollkommen unauffällig ist (Gruppe 3). Es besteht eine BWS-Skoliose, sowie ausgeprägte Kontrakturen an den Ellbogen und Handgelenken. Der Patient kann frei sitzen, ist jedoch unfähig, die Arme über den Kopf zu heben und frei zu stehen bzw. zu laufen. Das klinische Bild spricht stark für das Vorliegen einer kongenitalen Muskeldystrophie vom Typ Ullrich, obwohl die Immunfluoreszenz-Färbung keinen Hinweis auf eine UCMD gibt. Differentialdiagnostisch muss auch hier an eine Bethlem Myopathie gedacht werden. Leider liegen zurzeit keine weiteren molekularbiologischen Untersuchungsergebnisse vor.

Ebenfalls gegen die These spricht das klinische Erscheinungsbild des Patienten 82/01 (Gruppe 1). Er weist ein klinisch relativ mildes Erscheinungsbild trotz eines deutlichen Mangels an Kollagen VI auf (Der Patient kann eigenständig laufen und sogar eine Treppe frei hinab gehen).

Anhand unserer Ergebnisse ist nicht davon auszugehen, dass eine direkte Korrelation zwischen den Ergebnissen der Immunfluoreszenz und der Schwere der Erkrankung besteht.

## 4.2 Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeiten

In verschiedenen Artikeln wurde ebenfalls über Immunfluoreszenzfärbung an Muskelkryostatschnitten mit verschiedenen Kollagen VI Antikörpern berichtet.

So benutzten Merlini und Demir et al. (Am. J. Hum. Genetic, 2002) ebenfalls die beiden Kollagen VI-Antikörper MAB 1944 und 3303 der Firma Chemicon. Die Ergebnisse mit den beiden unterschiedlichen Antikörpern zeigten jedoch im Gegensatz zu dieser Arbeit einheitlich eine identische Färbung. Von fünf Patienten mit klinischen Merkmalen einer UCMD, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, lagen von drei Patienten Muskelbiopsien vor. Zwei dieser Patienten wiesen eine milde Reduktion von Kollagen VI im Endomysium auf. Bei einem Patienten war die Färbung mit Kollagen VI Antikörpern komplett negativ. Färbungen mit anderen Antikörpern wie Laminin  $\alpha 2$ , Kollagen IV und Fibronectin waren unauffällig. Laut der Autoren scheint es keinen Zusammenhang zwischen Intensität der Färbung und Ausprägung der Krankheit zu geben.

Diese Theorie bestätigt sich auch in unserem Ergebnis. Ein Patient mit einer komplett unauffälligen Immunfluoreszenz (71/01) weist ein deutlich schwereres Erkrankungsbild auf als ein Patient, bei dem sich ein oder zwei Antikörper vermindert anfärben lassen (z.B. 18/01).

In der Arbeit von Mercuri et al. (Neurology 2002) wurden 15 Patienten untersucht, die klinisch eindeutige Merkmale einer UCMD aufwiesen. Für die

Immunfluoreszenzfärbung wurden ebenfalls die beiden Kollagen VI Antikörper MAB 1944 und MAB 3303 der Firma Chemicon benutzt. In dem Artikel wird nicht von unterschiedlichen Färbemustern berichtet. Von elf der 15 Patienten lagen Muskelbiopsien zur Untersuchung vor. Bei fünf Patienten fand man eine normale sarkolemmale und endomysiale Expression von Kollagen VI. Zwei Patienten zeigten nur leichte Spuren einer Expression, drei Patienten zeigten eine deutlich reduzierte Expression (vor allem im Bereich des Sarkolemmas) und ein Patient wies eine milde Reduktion der Expression von Kollagen VI auf. In dieser Arbeit ist ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Immunfluoreszenz und der Schwere des klinischen Erscheinungsbildes festzustellen. Es gibt Patienten mit einer vollständigen Defizienz von Kollagen VI, die klinisch nur leicht betroffen sind sowie Patienten mit einer unauffälligen Immunfluoreszenz-Färbung, die ein deutlich schwereres Erkrankungsbild zeigen. Auch das Vorhandensein von Kontrakturen, einer Skoliose oder einem Rigid spine Syndrom lässt keine Rückschlüsse auf die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zu.

In einer Arbeit von Vanegas et al. (PNAS 2001) wird von zwei Patienten mit UCMD berichtet, bei denen unter anderem Muskelschnitte mit einem monoklonalen Antikörper gerichtet gegen die leichte Kette von Kollagen VI (2C6, beschrieben von Hesse und Engvall, J. Biol. Chem. 1984) gefärbt wurden. Bei einem Patienten fiel eine komplette Defizienz von Kollagen VI auf, bei dem anderen Patienten eine drastische Reduktion von Kollagen VI. Die Autoren schließen daraus, dass die Immunfluoreszenz ein geeignetes Screening-Verfahren ist, um eine Ullrich Muskeldystrophie zu diagnostizieren.

Grundsätzlich muss man dieser Aussage zustimmen. Bei unserer Arbeit sind sieben Patienten mit einem zumindest partiellen Mangel an Kollagen VI aufgefallen, sodass sich aufgrund der Immunfluoreszenz-Färbung die Verdachtsdiagnose einer Ullrich Muskeldystrophie ergibt. Allerdings scheint es auch Patienten zu geben (71/01), bei denen das klinische Erscheinungsbild typisch für eine UCMD ist, die Immunfluoreszenz sich jedoch als unauffällig darstellt. Diese Tatsache wird auch von anderen Autoren beschrieben, so z.B. von

Mercuri et al. (Neurology 2002). In dieser Arbeit zeigten fünf von elf untersuchten Muskelbiopsien eine unauffällige Immunfluoreszenzfärbung.

Diese an einer UCMD erkrankten Patienten würde man allein durch dieses Screeningverfahren nicht erfassen.

Bei einer unauffälligen Immunfluoreszenz muss differenzialdiagnostisch auch an die Bethlem Myopathie gedacht werden, die sich immunhistochemisch meist unauffällig darstellt (Lampe, Bushby, 2005).

Zur definitiven Diagnosestellung sollten weitergehende molekularbiologische Untersuchungen vorgenommen werden.

C. Jimenez-Mallebrera et al. veröffentlichten 2006 eine Arbeit, in der ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Reduktion von Kollagen VI in der Immunfluoreszenz von Muskeln und Haut-Fibroblasten und dem klinischen Erscheinungsbild gefunden wurde. Des Weiteren konnte keine direkte Korrelation zwischen den Ergebnisse der Immunfluoreszenz und dem Typ der Vererbung oder dem klinischen Erkrankungsbild gefunden wurde. Es zeigt sich, dass auch die Analyse von Haut-Fibroblasten eine sinnvolle und sensitive Technik darstellen kann, um Kollagen VI-Anomalitäten aufzudecken. In dieser Arbeit wurden keine Fibroblasten untersucht.

2007 beobachteten Kawahara et al. sarkolemmal-spezifische Kollagen VI-Defizienzen in Muskel-Biopsien von Patienten, bei denen eine heterozygote *COL6A1* G284R Mutation in der N-terminalen Region der Tripel-Helix-Domäne nachgewiesen werden konnte. Kollagen VI war im Interstitium vorhanden, jedoch im Sarkolemma nur wenig nachzuweisen; Patienten mit gemischten heterozygoten *COL6A1* Mutationen hatten eine komplette Absenz des Proteins. Die Elektronenmikroskopie hat gezeigt, dass die Kollagen VI-Fibrillen nicht an die Basis-Membran binden. Kawahara schloss aus diesen Studien, dass heterozygote Mutationen im *COL6A1* Gen zu einer herabgesetzten Bindung von Kollagen VI zur Extrazellulärmatrix führen können.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit ist bereits 2002 durchgeführt worden. Es lagen noch keine vollständigen molekulargenetischen Ergebnisse der Mutationen der Patienten vor.

Es wäre wie gesagt sinnvoll, auch von den Patienten, die in dieser Studie untersucht worden sind, molekulargenetische Untersuchungen vorzunehmen, um Mutationen in den *COL6* Genen herauszufinden und mit den Ergebnissen anderen Studien zu vergleichen.

### 4.3 Unterschiede in der Intensität der Färbung mit verschiedenen Kollagen VI Antikörpern

In dieser Arbeit wird erstmalig über unterschiedliche Ergebnisse in der Immunfluoreszenz-Färbung mit unterschiedlichen Kollagen VI Antikörpern berichtet. Bislang wurden die drei Antikörper MAB 1944, MAB 3303 und N9-N2 noch nicht miteinander verglichen. In vorangegangenen Arbeiten wurden die Antikörper MAB 3303 und MAB 194 parallel benutzt; allerdings zeigte sich kein Unterschied in der Immunfluoreszenz-Färbung (Mercuri et al., 2002; Merlini, Demir et al., 2002).

Es lässt sich anhand meiner Ergebnisse und Ergebnisse anderer Studien zusammenfassend feststellen, dass kein direkter Rückschluss von der Immunfluoreszenz auf den Schweregrad der Erkrankung möglich ist. In dieser Arbeit zeigt sich zudem, dass auch die unterschiedliche Anfärbbarkeit verschiedener Kollagen VI Antikörper keine Korrelation zum Krankheitsbild darstellt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Färbung bei der UCMD steht zum Beispiel die Duchenne-Muskeldystrophie, bei der eindeutig eine Beziehung zwischen der Schwere der Krankheit und der Intensität der Färbung besteht.



Über die unterschiedlichen Färbeergebnisse der verschiedenen Kollagen VI-Antikörper meiner Immunfluoreszenz, die in anderen Studien nicht beschrieben worden sind, lässt sich diskutieren.

Somit hängt z.B. vom jeweiligen Betrachter ab, als wie intensiv eine Färbung angesehen wird. Eine leichtgradige Verminderung nach Meinung des einen Untersuchers würde sich vielleicht bei einem anderen Untersucher als noch normale Färbung darstellen.

Des Weiteren können theoretisch Unterschiede in der Technik der Immunfluoreszenz oder des Mikroskopieren zu Differenzen im Erscheinungsbild führen. So könnten trotz standardisierter Untersuchungsmethoden kleine Unterschiede bei den Färbungen auftreten. Z.B. kann die Inkubationsdauer der Antikörper um kurze Zeit variieren. Die Temperatur in der feuchten Kammer sollte auf 37°C eingestellt sein; auch hier könnte es leichte Schwankungen geben.

Die Einstellungen des Mikroskops können sich ebenfalls bei verschiedenen Anwendungen unterscheiden und somit Unterschiede in den Färbungen vortäuschen.

Auch Artefakte durch ältere Proben können nicht ausgeschlossen werden.

Die natürliche biologische Varianz kann zu Unterschieden in den Färbungen führen. Darüber hinaus sind epigenetische Gründe als Ursache für Varianzen in den Immunfluoreszenz-Färbungen nicht auszuschließen.

Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die verschiedenen Kollagen VI Antikörper sich gegen bestimmte Epitope der Kollagen VI Ketten richten. Somit kann die These aufgestellt werden, dass die unterschiedlichen Färbeergebnisse darauf beruhen, dass aufgrund einer Mutation bestimmte Teile von Kollagen VI nicht exprimiert werden und somit der Antikörper, der sich gegen diese Epitope richtet, nicht angefärbt wird.

Die Mutationen führen meist entweder zu einem vorzeitigen Stop-Codon, sodass eine verkürzte Kette entsteht, oder zu einer Missense-Mutation, bei der die jeweilige Kollagen VI Kette aus anderen Aminosäuren besteht.

Die monoklonalen Antikörper MAB 1944 und MAB 3303 stammen von der Firma Chemicon International. Der Antikörper MAB 3303 erkennt die Tripel Helix, die aus der  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  Kette besteht. Das genaue Epitop wurde bisher nicht entschlüsselt. Es ist bekannt, dass der Antikörper nicht mit Kollagen I, II, III, IV oder V in nativen Geweben reagiert. Bei dem Kollagen VI Antikörper MAB 1944 gibt es bisher leider keine näheren Angaben dazu, gegen welche speziellen Strukturen er sich richtet. Daher ist es momentan nicht möglich, Rückschlüsse auf den genetischen Defekt zu ziehen, der eine verminderte Anfärbbarkeit mit den Kollagen VI-Antikörpern verursacht.

Der Antikörper „N9-N2“ wurde 1992 von Ulrichs Specks et al. produziert. Der Antikörper richtet sich gegen die Position 1-1586 der menschlichen  $\alpha 3$  (VI) Kette (N9-N2 vom N-Terminus der Kette) (The Embo Journal 1992). Dieser Antikörper richtet sich gegen 32% der Masse des gesamten Kollagen VI-Moleküls.

Eine verminderte Anfärbung des Kollagen VI-Antikörpers N9-N2 legt die Vermutung nahe, dass sich eine Mutation im Bereich des *COL6A3* Gens zugetragen hat. Aufgrund dieser Arbeit lässt sich allerdings keine Aussage darüber treffen, was für Folgen dieses für die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette von Kollagen VI hat und wie hierdurch die Immunfluoreszenz beeinflusst wird.

#### 4.4 Ergebnis Mutationsanalyse Patient 139/01

Von den meisten Patienten liegen bisher keine molekularbiologischen Untersuchungen vor.

Mittlerweile ist von dem Patienten 139/01 eine Mutationsanalyse (Anna Brunn, Janina Ratke, Ralf Herrmann, Thomas Voit, Essen) durchgeführt worden. Es konnte eine Missense-Mutation in Exon 25 nachgewiesen werden. Dieses führt zu einem C-T-Austausch in Position 6653. Diese Mutation ist im *COL6A3*-Gen auf Chromosom 2q37 lokalisiert und wurde ebenfalls von Lampe et al. mittels der SCAIP-Methode nachgewiesen (J Med Genet 2005).

## 4.5 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung mit Neonatalem Myosin und Laminin $\alpha 5$

Über die Ergebnisse anderer Proteine bei der Immunfluoreszenz-Färbung wurde in anderen Artikeln bisher kaum berichtet. In dieser Arbeit zeigte neonatales Myosin bei den Patienten mit färberisch nachgewiesenem Kollagen VI-Mangel bis auf bei Patient 139/01 eine deutliche Überexpression. Patient 139/01 weist nur eine leichte Expression auf. Die Überexpression ist als Zeichen einer Regeneration von Muskelfasern zu werten. Es ist kein Zusammenhang zwischen der Expression von neonatalem Myosin und der Schwere des Krankheitsbildes festzustellen. In anderen Arbeiten ist bisher nicht über vergleichende Färbungen mit neonatalem Myosin berichtet worden.

Des Weiteren haben wir auch Laminin  $\alpha 5$  mit gefärbt. Laminin  $\alpha 5$  färbt in normalem Muskel nur die Gefäße, in pathologisch veränderten Muskeln auch sarkolemmale Bereiche an. Bei der MDC1A ist Laminin  $\alpha 5$  aufgrund des Mangels an Laminin  $\alpha 2$  kompensatorisch erhöht. Somit ist Laminin  $\alpha 5$  ein spezifischer Marker für die Merosin-defizienten Muskeldystrophien.

Laminin  $\alpha 5$  wurde bis auf die Patienten 117/01 und 60/99 bei den Patienten mit einem vollständigen oder partiellen Mangel von Kollagen VI nicht exprimiert.

Patient 117/01 weist eine muskuläre Hypotonie auf, kann nicht eigenständig stehen oder laufen und weist leichte Beugekontrakturen in Knien und Füßen auf.

Patient 60/99 wurde bereits oben beschrieben. Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch die Expression von Laminin  $\alpha 5$  keine Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung zulassen.

Diese von der Normalkontrolle abweichende Expressionsmuster für die Laminin  $\alpha 5$ -Kette sind als eine unspezifische Sekundärveränderung anzusehen. Folglich ist Laminin  $\alpha 5$  nicht als spezifischer Marker für die UCMD zu sehen. Darüber hinaus scheint die Expression von Laminin  $\alpha 5$  auch keinen positiven Effekt auf die UCMD zu haben.

## 4.6 Diagnosen der Patienten mit unauffälliger Immunfluoreszenz-Färbung

Bei einigen anderen unserer Patienten ohne Nachweise eines Kollagen VI-Mangels sind nach Fertigstellen des experimentellen Teils dieser Arbeit Muskeldystrophien eines anderen Typs diagnostiziert worden:

Patient 11/00 leidet an einer kongenitalen Muskeldystrophie mit Rigid Spine Syndrom. Es konnte eine Mutation im Seleno-Protein-Gen (SEPN1-Defekt) nachgewiesen werden.

Bei den Patienten 55/99 und Patient 28/99 ist ebenfalls eine Muskeldystrophie mit Rigid Spine diagnostiziert worden.

Eine kongenitale Muskeldystrophie mit sekundärer Laminin  $\alpha 2$ -Defizienz (MDC1B) wurde bei Patient 02/01 diagnostiziert. In der Muskelbiopsie fallen immunhistochemisch ein sekundärer partieller Laminin  $\alpha 2$ -Mangel und eine sekundäre Reduktion von  $\alpha$ -Dystroglycan auf.

Die Mutationsanalyse bei Patient 17/97 ergab eine kongenitale Muskeldystrophie mit dem Nachweis einer Mutation I 373M im Lamin-A-Gen.

Bei Patient 130/01 konnte die Diagnose kongenitale Muskeldystrophie bisher nicht verifiziert werden. Es steht die Diagnose einer Bindegewebsschwäche.

Die Diagnose bei Patient 141/01 lautet Tetradysmelie-Syndrom mit Oligosyndaktylie, bislang neuromuskulär ungeklärt

## 4.7 Methodenkritik Immunfluoreszenz

Ein Vorteil der Immunfluoreszenz ist die direkte Darstellung des Kollagen VI-Moleküls durch die Bindung der Antikörper an das Proteinmolekül in der Membran. Somit sind bereits kleine Mengen Kollagen VI an jeder Faser zu erkennen.

Ein weiterer Vorteil der Immunfluoreszenz liegt darin, dass die Integrität der Plasmamembran direkt an der Färbung beurteilt werden kann und somit Aussagen über den Zustand bzw. den Zerstörungsgrad der Muskelmembran zu treffen sind. Auch histologische Aussagen über Verfettung und bindegewebigen Ersatz zerstörter Fasern sind mikroskopisch unabhängig von der Immunfluoreszenz möglich.

Leider können mit der Immunfluoreszenz anhand der benutzten Antikörper keine gezielten Aussagen darüber getroffen werden, ob das gesamte Kollagen VI-Molekül vermindert gebildet wird oder nur einzelne Anteile und sich somit die unterschiedliche Anfärbung erklären würde. Es kann durch die Immunfluoreszenz fast kein Rückschluss auf die vorliegende Mutation getroffen werden. Ausnahme: Kawahra et al. fanden 2007 heraus, dass Patienten mit einer sarkolemmal-spezifischen Defizienz von Kollagen VI eine heterozygote Mutation *COL6A1* G284R im N-terminalen Region der Tripel-Helix-Domäne aufwiesen.

Nach unseren Ergebnissen und Ergebnissen anderer Studien scheint keine Korrelation zwischen dem Ergebnis der Immunfluoreszenz und dem Ausmaß der Erkrankung vorzuliegen, so dass keine prognostischen Aussagen mit dieser Methode getroffen werden können.

## 4.8 Ausblick

Nach Abschluss dieser Arbeit ist festzustellen, dass sich die Immunfluoreszenz mit Kollagen VI Antikörpern als Screening-Verfahren für eine UCMD eignet. Die Ergebnisse zeigen eine relativ hohe Sensitivität der Untersuchungsmethode. Genaue Aussagen zur Sensitivität und Spezifität lassen sich allerdings aufgrund der nur geringen Patientenzahl nicht treffen. Wichtige weiterführende Untersuchungen sind molekularbiologische Methoden. Anhand von automatischen Genom-Sequenz-Analysen der Kollagen VI-Gene lassen sich die ursächlichen Mutationen, die eine UCMD oder eine BM verursachen, darstellen. Des Weiteren werden mittlerweile Untersuchungen durchgeführt, die die Kollagen-Expression oder die Zusammensetzung der Kollagen VI Fibrillen im Extrazellulärraum untersuchen. Auch Untersuchungen von Haut-Fibroblasten sollten miteinbezogen werden, da auch diese Rückschlüsse über die UCMD erlauben.

Angelin et al. identifizierten 2007 erhöhte Apoptose-Raten in Skelett-Muskel-Biopsien und Myoblasten-Kulturen von fünf, nicht miteinander verwandten Patienten mit einem unterschiedlichen Schweregrad einer UCMD. Das Zufügen

von Oligomycin, einem selektiven mitochondrialen Inhibitor, führte zu einer mitochondrialen Depolarisation von Myoblasten in UCMD-Patienten, aber nicht bei gesunden Probanden. Die Elektronenmikroskopie zeigte eine abnorme Mitochondrien-Morphologie, die vergrößerte Mitochondrien und eine hypodense Matrix mit fehlenden Cristae einschließt. Ein Überzug mit Kollagen VI oder die Behandlung mit Cyclosporin A oder Kalzium-Chelatoren konnten die Anomalitäten normalisieren und die Apoptose-Rate vermindern. Angelin et al. schlossen aus diesen Ergebnissen, dass eine mitochondriale Dysfunktion in die Pathogenese der UCMD mit involviert ist. Diese Korrelation wurde in der vorliegenden Arbeit bisher nicht untersucht.

Merlini et al. berichteten in einer Arbeit von 2008 von vier UCMD-Patienten, die mit Cyclosporin A behandelt worden sind. Die Patienten wiesen eine verminderte mitochondriale Dysfunktion und verminderte Apoptose-Rate in Skelettmuskel-Biopsien bereits einen Monat später auf. Zelluläre Zeichen der Muskelregeneration konnten ebenfalls beobachtet werden. Das klinische Ansprechen konnte aufgrund der bislang nur kurzen Beobachtungsdauer nicht sicher beurteilt werden. Auch mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Dysfunktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese der UCMD spielt.

Für die Patienten, die an einer UCMD leiden, sind diese Erkenntnisse sehr wertvoll, vor allem, da eventuell eine neue Behandlungsmethode entdeckt worden ist.

Schlussendlich gilt erneut zu sagen, dass zum Zeitpunkt der Erstellung des experimentellen Teils dieser Arbeit die aktuellen Ergebnisse und Erkenntnisse aus den neuesten Studien noch nicht vorlagen. Es ist sicherlich äußerst interessant und sinnvoll, die Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit eine UCMD diagnostiziert worden sind, mit molekularbiologischen Methoden weiter zu untersuchen und näher zu klassifizieren.

## 4.9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Muskelbiopsien von 17 Patienten, die klinische Merkmale einer UCMD (Ullrich kongenitale Muskeldystrophie) aufweisen, mittels Immunfluoreszenz auf einen Kollagen VI Mangel untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Kollagen VI-Antikörper verwendet.

Bei sieben der 17 Patienten (41,1%) zeigt sich ein Kollagen VI Mangel bei der Färbung mit Kollagen VI-Antikörpern. Davon weisen fünf Patienten (29,4 %) eine verminderte Anfärbung aller drei Antikörper auf, zwei Patienten (11,7%) zeigen eine verminderte Anfärbung eines oder zweier Kollagen VI-Antikörper. Die anderen Antikörper waren normal angefärbt. Bei einem Patienten (71/01) wurde aufgrund der klinischen Merkmale die Diagnose UCMD gestellt, die Expression von Kollagen VI im Muskelgewebe in der Immunfluoreszenz zeigt sich jedoch unauffällig.

Vor Beginn der Arbeit stellte sich die Frage, ob die Intensität der Anfärbung der verschiedenen Antikörper Rückschlüsse auf das klinische Erscheinungsbild zulässt. Diese These muss verworfen werden. Patienten, die keine Auffälligkeiten in der Immunfluoreszenz aufweisen, zeigen teilweise eine deutlich schwerere Symptomatik als Patienten, bei denen sich ein oder mehrere Antikörper nur vermindert darstellen lassen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Immunfluoreszenz-Färbung als Screening-Verfahren für eine UCMD durchaus geeignet ist. Jedoch lässt sich aufgrund der Immunfluoreszenz bisher keine direkte Aussage darüber treffen, welches Gen des Kollagen VI betroffen ist, oder welcher Mechanismus zur Mutation geführt hat. Diesbezüglich sind molekularbiologische Untersuchungen weitaus Erfolg versprechender.

Ebenso kann anhand der Immunfluoreszenz-Ergebnisse keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Patient an einer kongenitalen Muskeldystrophie vom Typ Ullrich oder einer Bethlem Myopathie leidet.

## 5 Literatur

- (1) Angelin, A, Tiepolo, T, Sabatelli, P, Grumati, P, Bergamin, N, Golfieri, C, Mattioli, E, Gualandi, F, Ferlini, A, Merlini, L, Maraldi, N.M, Bonaldo, P, Bernardi, P

**Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins**

Proc. Nat. Acad. Sci 2007, 104: 991-996

- (2) Baker, N, Mörgelin, M, Peat, R, Goemans, N, North, K, Bateman, J, Lamandé, S

**Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy**

Human Molecular Genetics 2005 , 14., No. 2: 279-293.

- (3) Ball, S, Bella, J, Kielty, C, Shuttleworth, A

**Structural Basis of Type VI Collagen Dimer Formation**

Journal of Biological Chemistry 2003, 278:15326-15332,

- (4) Borckington, M, Brown, S, Lampe, A, Yuva, Y, Feng, L, Jimenez-Mallebrera, C, Sewry, C, Flanigan, K., Bushby, K, Muntoni, F

**Prenatal diagnosis of Ullrich congenital muscular dystrophy using haplotype analysis and collagen VI immunocytochemistry**

Prenatal Diagnosis 2004, 24: 440-444

- (5) Demir E, Sabatelli P, Allamand V, Ferreira A, Moghadaszadeh B, Makrelouf M, Topaloglu H, Echenne B, Merlini L, Guicheney P

**Mutations in COL6A3 Cause Severe and Mild Phenotypes of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy**

Am. J. Hum. Genet. 2002, 70:1446-458



- (6) Demir, E, Ferreiro, A, Sabatelli, P, Allamand, V, Makri, S, Echenne, B, Maraldi, M, Merlini, L, Topaloglu, h, Guicheney, P  
**Collagen VI status and clinical severity in Ullrich congenital muscular dystrophy: phenotype analysis of 11 families linked to the COL6 loci.**  
Neuropediatrics. 2004 Apr;35(2):103-12
- (7) De Paillette L, Aicardi J, Goutiere F  
**Ullrich´s congenital atonis sclerotic muscular dystrophy**  
J Neurol 236 1989:108-110
- (8) Engvall E, Hessle H, Klier G  
**Molecular Assembly, Secretion and Matrix Deposition of Type VI Collagen**  
The Journal of Cell Biology, Volume 102, 1986, 703-710
- (9) Hessle H, Engvall E  
**Type VI Collagen**  
**Studies on its localization, structure and biosynthetic form with monoclonal antibodies**  
The Journal of Biological Chemistry, 1984 Vol 259, No 6, 3955-3961
- (10) Herrmann R, Straub V, Meyer K, Kahn T, Wagner M, Voit T  
**Congenital muscular dystrophy with laminin a2 chain deficiency: Identification of a new intermediate phenotype and correlation of clinical findings to muscle immunohistochemistry**  
Eur J Pediatr (1996) 155:968-976
- (11) Higuchi I, Shiraishi T, Hashiguchi T, Suehara M, Niiyama T, Nakagawa M, Arimura K, Maryuama I, Osame M  
**Frameshift Mutation in the Collagen VI Gene Causes Ullrich´s Disease**  
Ann Neurol 2001; 50: 261-265

- (12) Jimenez-Mallebra, C., Maioli, M., Kim, J., Brown, L., Feng, A., Lampe, K., Bushby, D., Hicks, K., Flanigan, C., Bonnemann, C.  
**Fibroblasts from 14 Ullrich congenital muscular dystrophy patients with dominant and recessive COL6A mutations**  
Neuromuscular Disorders 2006; 16: 571 - 582
- (13) Jöbsis, G, Keizers, H, Vreijling J, de Visser, M, Speer, M, Woltermann, R, Baas, F, Bolhuis P  
**Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures**  
Nat Genet 1996; 14: 113-5
- (14) Kirschner, J, Hausser, I, Zou, Y, Schreiber, G, Christen, H-J, Brown, S, Anton-Lamprecht, I, Muntoni, F, Hanefeld, F, Bönnemann, C  
**Ullrich congenital Muscular Dystrophy: Connective Tissue Abnormalities in the Skin Support Overlap With Ehlers-Danlos Syndromes**  
American Journal of Medical Genetics 2005;132A: 296-301
- (15) Lamande, S, Sigalas, E, Pan, T, Chu, M, Dziadek, M, Timpl, R, Bateman, J  
**The role of the alpha3 (VI) chain in collagen VI assembly. Expression of an alpha3 (VI) chain lacking N-terminal modules N10-N7 restores collagen VI assembly, secretion, and matrix deposition in an alpha3 (VI)-deficient cell line**  
Journal of Biological Chemistry 1998, 273;7: 423-430
- (16) Lampe, A, Bushby, K  
**Collagen VI related muscle disorders**  
J Med Genet 2005; 42: 673-685

- (17) Lampe, A, Dunn, D, von Niederhausen, A, Hamil, C, Aoyagi, A, Laval, A, Marie, S, Chu, M-L, Swoboda, K, Muntoni, F, Bonnemann, C, Flanigan, K, Bushby, K, Weiss, R

**Automated genomic sequence analysis of three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy**

J Med Genet, 2005; 42: 108-120

- (18) Merlini, L, Angelin, A, Tiepolo, T, Braghetta, P, Sabatelli, P, Zamparelli, A, Ferlini, A, Maraldi, N. M, Bonaldo, P, Bernardi, P

**Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction und muscle-apoptosis in patients with collagen VI myopathies**

Proc Nat Acad Sci, 2008; 105: 5225-5229

- (19) Mercuri E, Yuva Y, Brown S.C., Brockington M, Kinali M, Jungbluth H, Feng L, Sewry C, Muntoni F

**Collagen VI involvement in Ullrich syndrome**

Neurology 2002; 58:1354-1359

- (20) Myllyharju, J, Kivirikko, K.

**Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies und worms**

Trends in genetics 2004, 20: 33-43

- (21) Nonaka I, Une Y, Ishirara T, Miyoshino S, Nakashima T, Sugita H

**A clinical and histological study of Ullrichs Disease (Congenital Atonic-Sclerotic Muscular Dystrophy)**

Neuropediatrics 1981, Vol 12, No 3:197-208

- (22) Pan T, Zhang R, Sudano D, Marie S, Bönnemann C, Chu M  
**New Molecular Mechanism for Ullrich Congenital Muscular Dystrophy : A Heterozygous In-Frame-Deletion in the COL6A1 Gene Causes a Severe Phenotype**  
 Am. J. Hum. Genet. 2003, 73:355-369
- (23) Pepe, G, Bertini, E, Bonaldo, P, Bushby, K, Giusti, B, deVisser, M, Guicheney, P, Lattanzi, G, Merlini, L, Muntoni, F, Nishino, I, Nonaka, I, Yaou, R, Sabatelli, P, Sewry, C, Topaloglu, H, van der Koof, A  
**Bethlem Myopathy (BETHLEM) and Ullrich scleratonic muscular dystrophy: 100<sup>th</sup> ENMC International Workshop**  
 Neuromuscular disorders 2002, 12: 984-993
- (24) Pepe, G, Bertini, E, Giusti, B, Brunelli, T, Comeglio, P, Saitta B, Merlini, L, Chu, M, Federici, G, Abbate, R  
**A novel de novo mutation in the triple helix of the COL6A3 gene in a two-generation Italian family affected by Bethlem myopathy. A diagnostic approach in the mutations' screening of type VI collagen**  
 Neuromuscul. Disorders 1999, 9: 264-271
- (25) Reed, U, Ferreira, L, Liu, E, Resende, M, Carvalho, M, Marie, S, Scuff, M  
**Ullrich Congenital Muscular Dystrophy und Bethlem Myopathy – Clinical and genetical heterogeneity**  
 Arq Neuropsiquiatre 2005, 63 (3-B):785-790
- (26) Specks, U, Mayer, U, Nischt, R, Spissinger, T, Mann, K, Timpl, R, Engel, J, Chu, M  
**Structure of recombinant N-terminal globule of type VI collagen  $\alpha 3$  chain and its binding to heparin and hyaluronan**  
 The EMBO Journal, 1992, 11, No 12: 4281-4290

- (27) Ullrich, O  
**Kongenitale atonisch-sklerotische Muskeldystrophie**  
Z Ges Neurol Pschiat 1930, 126:171-201
- (28) Vanegas, O, Bestini, E, Zhang, R, Petrini, S, Minasse, C, Sabatelli, P, Giusti, B, Chu, M, Pepe, G  
**Ullrich scleratonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI**  
PNAS, 2001, 98: 7516-7521
- (29) Vanegas, O, Zhang, R, Sabatelli, P, Lattanzi, G, Bencivenga, P, Giusti, B, Columbaro, M, Chu, M, Merlini, L, Pepe, G  
**Novel COL6A1 splicing mutation in a family affected by mild Bethlem myopathy**  
Muscle nerve 2002; 25: 513-9
- (30) Voit T, Cohn R, Sperner J, Leube B, Sorokin L, Toda T, Herrmann R  
**Merosin-positive congenital muscular dystrophy with transient brain dysmyelination, pontocerebellar hypoplasia and mental retardation**  
Neuromuscular Disorders 1999, 9 : 95-101
- (31) Voit, T  
**Congenital muscular dystrophies: 1997 update**  
Brain & Development 1998, 20: 65-74
- (32) Weil, D, Mattei, M, Passage, E, N'Guyen, V, Pribula-Conway D, Mann, K, Deutzmann, R, Timpl, R, Chu, M  
**Cloning and chromosomal localization of human genes encoding the three chains of type VI collagen**  
American Journal of Human Genetics 1988; 42: 435-445

(33) Zhang, R, Sabatelli, P, Pan, T, Squarzoni, S, Mattioli, E, Bertini, E, Pepe, G, Chu, M

**Effects on Collagen VI mRNA Stability and Microfibrillar Assembly of Three COL6A2 Mutations in Two Families with Ullrich Congenital Muscular Dystrophy**

The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277, No 46: 43557-43564

## 6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	kongenitale Muskeldystrophien, modifiziert nach Muntoni (Eur J Ped Neurol 2002) .....	8
Tabelle 2	Kollagentypen und ihr Vorkommen .....	12
Tabelle 3	klinische Daten der Patienten.....	28
Tabelle 4	Liste der primären Antikörper .....	39
Tabelle 5	Ergebnisse der Immunfluoreszenz .....	48

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zusammensetzung der Zellmembran (nach Muntoni und Voit, NMD 2004) .....	2
Abbildung 2	A-D Klinische Bilder einer UCMD, nach Higushi et al. 2001.....	10
Abbildung 3	Zusammensetzung der Kollagen-VI Fibrillen, .....	13
Abbildung 4	Schema der identifizierten putativen Mutationen, nach Lampe et al 2005 .....	14
Abbildung 5	Patient 139/01 .....	32
Abbildung 6	Patient 18/01 .....	32



## 8 Danksagung

Ich möchte besonders Frau Priv.-Doz. Dr. Schara danken, dass sie die „Ersatz-Betreuung“ meiner Arbeit spontan übernommen hat und jederzeit äußerst hilfsbereit und geduldig war.

Danke auch an die Mitarbeiter des neuromuskulären Labors, allen voran Herrn Ralf Herrmann für die tatkräftige Unterstützung und stets freundliche Anleitung bei der Arbeit im Labor für neuromuskuläre Erkrankungen.

Ferner gilt meinen Eltern ein liebevoller Dank für die bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und weiteren beruflichen Ausbildung.

## 9 Lebenslauf

### Persönliches

Name:	Janina Lagocki
Geburtsdatum:	15. Juni 1978
Geburtsort:	Münster
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Heimatadresse:	Münster

### Schule

1984 – 1988	Grundschule Ottmarsbocholt
1988 – 1997	Wilhelm-Hittorf-Gymnasium Münster
1997	allgemeine Hochschulreife

### Studium

1997 – 1999	Beginn des Medizinstudiums an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Herbst 1999	ärztliche Vorprüfung
1999 – 2004	Fortsetzung des Studiums an der Universität Duisburg-Essen
Herbst 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Herbst 2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr 04/2003 – 04/2004

Erstes Tertial: Innere Medizin,  
Universitätsklinikum Essen

Zweites Tertial: Kinderheilkunde,  
Universitätsklinikum Essen

Drittes Tertial: Chirurgie,  
Universitätsklinikum Essen

Mai 2004

Dritter Abschnitt der ärztlichen  
Prüfung

15.06.2004 – 30.09.2004

Ärztin im Praktikum im Josephs  
Hospital Warendorf in der Abteilung  
für Innere Medizin

01.10.2004

Approbation als Ärztin

01.10.2004 – 30.09.2007

Assistenzärztin im Josephs  
Hospital Warendorf in der Abteilung  
für Innere Medizin

01.10.2007 – 30.09.2008

Assistenzärztin im evangelischen  
Krankenhaus Hamm in der  
Abteilung für Hämatologie und  
Onkologie

Seit 01.10.2008

Assistenzärztin in der  
Universitätsklinik Münster in der  
Abteilung für Hämatologie und  
Onkologie